

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**UN NUEVO GLICOFOSFOLIPIDO ESTA PRESENTE EN LA  
MEMBRANA DE LA CÉLULA GRANULOSA OVÁRICA Y ES  
HIDROLIZADO POR HCG Y PROLACTINA**

**MARÍA ISABEL MARRERO ARENCIBIA**

Las Palmas de Gran Canaria, 1990

FACULTAD DE MEDICINA

UN NUEVO GLICOFOSFOLIPIDO ESTA PRESENTE EN LA MEMBRANA DE LA CELULA  
GRANULOSA OVARICA Y ES HIDROLIZADO POR hCG Y PROLACTINA

M<sup>a</sup> Isabel Marrero Arencibia

1990

Dña LUISA FERNANDA FANJUL RODRIGUEZ, Profesora Titular de Fisiología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, y

Dn CARLOS MANUEL RUIZ DE GALARRETA, Profesor Titular de Bioquímica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

CERTIFICAN:

Que Dña M<sup>a</sup> ISABEL MARRERO ARENCIBIA, Profesora Asociada de Fisiología de la Universidad de Las Palmas y alumna de Tercer Ciclo de la Universidad de Las Palmas, ha realizado bajo nuestra dirección la presente Tesis Doctoral, titulada: "UN NUEVO GLICOFOSFOLIPIDO ESTA PRESENTE EN LA MEMBRANA DE LA CELULA GRANULOSA OVARICA Y ES HIDROLIZADO POR LA hCG Y LA PROLACTINA", y que, hallándose concluída, autorizamos su presentación a fin de que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Las Palmas de G.C., Junio 1990

Fdo: Prof L.F. Fanjul Rodríguez

Fdo: Prof C.M. Ruíz de Galarreta

#### **AGRADECIMIENTOS:**

A la Dra. Luisa Fernanda Fanjul Rodríguez y el Dr. Carlos Manuel Ruíz de Galarreta Hernández, directores de este trabajo, por su apoyo y estímulo constantes.

Al Profesor Asociado D. Antonio S. Déniz Cáceres, por su cooperación científica y técnica, al Sr. D. Antonio Déniz Cáceres, por su permanente comprensión y aliento, a Antonio por su enorme calidad humana.

A mis compañeros del Departamento de Endocrinología Celular y Molecular, Lourdes, Juan, Pepe y José por su colaboración desinteresada; así como a Carlos, Angel, Tony, Sarmiento y Pilar.

A los que fueron miembros de otros departamentos del CULP y a los que aún lo son, por la ayuda que siempre estuvieron dispuestos a dar.

A Rajan, un gran amigo.

Al Profesor Asociado D. Manuel Quintana, de la Escuela de Empresariales, por la colaboración prestada en la impresión de esta Tesis.

A todos aquellos que de una u otra forma han hecho posible la realización de este trabajo, tanto por su aportación científica como por la humana.

A Paqui e Isabel

A Pedro, Juan Domingo y Orlando,

son mi familia, y hacen que

todo sea posible

## I N D I C E

PROLOGO	1
1.- INTRODUCCION	3
I. Cómo se diferencia la célula granulosa ovárica	5
II. Hormonas y agonistas hormonales que diferencian la célula granulosa ovárica	9
III. Transmisión de la señal hormonal	28
IV. Los Fosfatidilinositol glicanos en la transmisión de la señal hormonal	40
2.- OBJETIVOS	45
3.- MATERIAL Y METODOS	48
1. Materiales utilizados	50
2. Obtención y cultivo de las células granulosa	53
3. Marcaje, extracción, separación y caracterización del Fosfatidilinositol glicano	55
4. Determinación de la concentración de proteínas	60
5. Ensayo de la actividad del enzima $3\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa $\Delta^4$ - $\Delta^5$ isomerasa	60
6. Tratamiento estadístico	62
4.- RESULTADOS	63
1. Observaciones morfológicas con el microscopio de contraste de fases	65
2. Identificación de los componentes de la cabeza polar del Fosfatidilinositol glicano	65
3. Identificación parcial de la cabeza polar del Fosfatidilinositol glicano	68
4. Identificación parcial de los componentes y estructura del esqueleto del fosfatidilinositol glicano	69

5. Efecto de las diferentes hormonas reguladoras de la diferenciación de la célula granulosa en el contenido y recambio del PI-glicano	71
6. Efecto del fosfooligosacárido sobre la actividad del enzima 3β-Hidroxiesteroide-deshidrogenasa $\Delta^4$ - $\Delta^5$ isomerasa	75
5.- DISCUSION	77
6.- CONCLUSIONES	91
7.- BIBLIOGRAFIA	94

ABREVIATURAS:

AA	Acido araquidónico
AC	Adenilil ciclase
ACTH	Hormona corticotropa
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	5' Adenosina difosfato
5'AMP	5' Adenosina monofosfato
AMPc = AMP-cíclico	3',5' Adenosina monofosfato cíclico
[AMPc]i	Concentración intracelular de AMPc
(Bu) <sub>2</sub> AMPc = dB AMPc	Dibutiril AMPc
ATP	Adenosina trifosfato
BrAMPc	8-Bromo-AMPc
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
CSCC P450= SCC P450	Enzima desramificante del colesterol citocromo P450
Ctx	Coleratoxina, toxina del <u>Vibrio cholerae</u>
DAG	Diacilglicerol
DES	Dietilestilbestrol
DPI	Fosfatidilinositol, 4 fosfato
E <sub>2</sub>	Estradiol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
Fk	Forskolín
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Acido $\gamma$ aminobutírico
Ga	D-Galactosa
GDP	Guanosina difosfato
GH	Hormona de crecimiento
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-Acetil-D-glucosamina
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GTP	Guanosina trifosfato
hCG: LH/hCG	Hormona gonadotropina coriógica humana
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMG-CoA reductasa	Enzima 3 hidroxil-3 metil glutaril coenzima A Reductasa
H-R	Complejo hormona-receptor
20 $\alpha$ -HSD	Enzima 20 $\alpha$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa

3 $\beta$ -HSD	Enzima 3 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa / $\Delta^5-\Delta^4$ Isomerasa (E.C. 1.1.1.51)
IGFs	Factores de crecimiento similares a la insulina
IGF-I= Sm C	Factor de crecimiento similar a la insulina-I o Somatomedina C
IP <sub>3</sub>	Inositol 1, 4, 5 trifosfato
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LH: LH/hCG	Hormona luteinizante
Mix	3-metil-isobutil-xantina
NGF	Factor de crecimiento neurogénico
OMI	Inhibidor de la maduración del ocito
PA	Acido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PDGF	Factor de crecimiento plaquetario
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Prostaglandina
PI	Fosfatidilinositol
PI-G= PI-glicano	Fosfatidilinositol glicano
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipasa C
PLC-PI	Fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol
PLD	Fosfolipasa D
POS	Fosfoligosacárido, cabeza polar del fosfatidilinositol glicano
PRL	Prolactina
Pro	Progesterona
20 $\alpha$ -OH-Pro	20 $\alpha$ -hidrox-preg-4-en-3-ona, 20 $\alpha$ -hidroxiprogesterona
PS	Fosfatidilserina
SER	Sistema retículo endoplásmico
TCA	Acido tricloroacético
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TGF $\alpha$	Transforming growth factor $\alpha$
tPA	Activador del plasminógeno tisular
TPA	12-O-Tetradecanoil-forbol-13 acetato
TPI	Fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato

La proliferación y diferenciación de las células granulosa del folículo ovárico es necesaria para que la ovulación en los mamíferos tenga lugar correctamente. Además, el mantenimiento de las primeras fases de la gestación depende de la diferenciación terminal de las células granulosa a células luteales, quienes serán la principal fuente de secreción de la progesterona.

Las células granulosa están contenidas en el folículo ovárico, que es la unidad funcional básica de la gónada. Un folículo maduro está formado por varias capas externas de células denominadas tecales que rodean capas interiores de células granulosa situadas en torno al complejo oocito-cúmulo más interno. La capa más externa de células granulosa está separada de los vasos sanguíneos y las células tecales por una membrana basal que rodea al folículo. Durante la vida de la hembra, sólo un número limitado de folículos seleccionados, aquellos cuyas células granulosa alcanzan la diferenciación adecuada, se rompen liberando un óvulo maduro, los restantes sufrirán un proceso de atresia. La maduración de los folículos ováricos y su transformación en cuerpo lúteo, descrita ya por Regnier de Graaf en 1672, está regulada por las gonadotrofinas hipofisarias. En respuesta a su secreción cíclica, los diferentes compartimientos foliculares interactúan de una forma altamente integrada para secretar hormonas sexuales esteroideas, estrógenos y progestágenos, y producir un óvulo fecundable. Además de las hormonas hipofisarias, un amplio número de señales hormonales y neuromoduladoras son corresponsables del éxito del proceso de transformación de la célula granulosa en luteal, en el cual participa también la propia célula adquiriendo escalonadamente receptores a nuevos agonistas. La aparición de estos nuevos receptores, a agonistas que en algunas ocasiones son

producidos localmente por la propia célula granulosa o por otras células foliculares, hace posible una regulación aún más sofisticada del proceso de diferenciación de la célula granulosa.

Al igual que en muchos otros órganos y tejidos de mamíferos, el conocimiento de los mecanismos celulares que son la base de los procesos de proliferación y diferenciación de la célula granulosa ovárica, no experimentó grandes avances hasta que las técnicas habituales en biología celular pudieron ser utilizadas.

Afortunadamente, los diversos cultivos primarios desarrollados en los últimos años, han proporcionado modelos experimentales que van desde las iniciales células granulosa aisladas de folículos porcinos e incubadas durante cortos períodos de tiempo, que utilizaron Bjersing y Carstensen (1), hasta el modelo que ha sido usado en la realización de este trabajo, originalmente validado por Erickson y Hsueh (2), y en el que las células granulosa son mantenidas en cultivo primario en medio libre de suero.

Sólo con la utilización de estos modelos experimentales ha podido conocerse el elevado número de factores implicados en la regulación de la función de la célula granulosa y descifrarse las complejas interacciones existentes entre ellos, que se describen en la introducción de esta tesis doctoral.

## 1. INTRODUCCION

I .-	COMO SE DIFERENCIA LA CELULA GRANULOSA OVARICA	5
II .-	HORMONAS Y AGONISTAS HORMONALES QUE DIFERENCIAN LA CELULA GRANULOSA OVARICA	9
III .-	TRANSMISION DE LA SEÑAL HORMONAL	28
IV .-	LOS FOSFATIDILINOSITOL GLICANOS EN LA TRANSMISION DE LA SEÑAL HORMONAL	40

## I.- COMO SE DIFERENCIA LA CELULA GRANULOSA OVARICA

Embriológicamente, las células granulosa parecen tener su origen en la "rete ovarii" localizada en la médula ovárica. Estas células emigran hacia la parte más interna de la corteza ovárica y rodean a los oocitos, momento en el que quedan constituidas las unidades funcionales del ovario, los folículos, y pasan a denominarse células granulosa (3).

Puesto que a partir del momento de la inclusión de las células granulosa en el folículo, las diferentes fases de la foliculogénesis se fundamentan en y correlacionan con los cambios morfológicos y bioquímicos observados en las células granulosa, describiremos las distintas fases del desarrollo folicular en función del grado de diferenciación alcanzado por las células granulosa que contienen.

En el **FOLICULO PRIMORDIAL**, el oocito, con la primera meiosis detenida en la fase de diplotene, está rodeado de una capa única de células granulosa que tienen una forma plana epitelióide y no presentan ninguna función diferenciada (4).

En el **FOLICULO PRIMARIO** las células granulosa pasan a ser cuboidales y proliferan formando varias capas. Además, aparecen las uniones gap, que podrían proporcionar una base anatómica para la comunicación intercelular durante la foliculogénesis. Se cree que a través de ellas, iones y moléculas de peso molecular bajo (ej. AMPc o esteroides) serían transferidas entre células adyacentes (5). Estas estructuras están ausentes en la fase anterior de folí-

culo primordial, en la que los elementos dominantes en los complejos de unión intercelular son los desmosomas y las uniones tipo zonula adherens (sólo útiles para unir mecánicamente las células o para sellar el espacio intercelular) (6). Las uniones gap se mantienen durante todo el desarrollo folicular, aumentando en número y tamaño a lo largo del mismo.

Desde el punto de vista funcional la célula granulosa del folículo primario se caracteriza por la aparición de receptores específicos de membrana a distintas hormonas proteicas. Los primeros y más importantes son los receptores de FSH (7), cuya presencia señala el inicio del proceso de diferenciación. El estímulo que induce su aparición parece estar relacionado con los altos niveles de FSH existentes en el momento de la formación del folículo primario (8). Después, aparecen receptores al GnRH (9), péptido hipotalámico, para el que se ha identificado en la célula granulosa un receptor con dos componentes de Pm diferente (10); uno de 60,000 daltons, semejante al del receptor hipofisario, el otro de Pm 54,000 daltons, no detectado en hipófisis, y que puede estar relacionado con las funciones específicas del GnRH en el ovario. Se ha detectado además en el folículo primario, la presencia de receptores a otros péptidos de origen diverso tales como la Angiotensina II (11); factores de crecimiento IGFs (11,12), EGF (13,14), TGF $\beta$  (15); la Insulina (16) y la Interleuquina I (17); y lipoproteínas: HDL (rata) (18) y LDL (humanos) (19). También pueden detectarse receptores de membrana a  $\beta$ -Adrenérgicos (20), GABA (21) y Adenosina (22).

En la fase de folículo primario comienzan además a aparecer los receptores citosólicos a los estrógenos (23,24), capaces de unir no sólo el estradiol sino también sus análogos sintéticos como el dietilestilbestrol (DES), Progesterona (25), Testosterona (26) y Glucocorticoides (27).

En el FOLICULO SECUNDARIO se inicia la formación del fluido folicular, cuya acumulación da lugar a la aparición de la cavidad antral (4,24). El antro es el signo morfológico definitorio de esta fase folicular, de su crecimiento progresivo depende, casi exclusivamente, el aumento del diámetro del folículo secundario, desde aproximadamente 200  $\mu$  a 2 cm (4), dependiendo de las especies.

En las células granulosa tiene lugar la síntesis y secreción de los mucopolisacáridos (4,28), síntesis y secreción que constituye el primer paso en la formación del fluido folicular. El fluido folicular contiene además la mayoría de las proteínas plasmáticas en concentraciones similares a las de la circulación periférica (4), con la excepción de las gonadotropinas hipofisarias cuyas concentraciones son cuidadosamente controladas. También están presentes en el fluido folicular concentraciones inusitadamente altas de esteroides sexuales (29).

Las cifras de progesterona y estradiol, al igual que las de las hormonas proteicas, sufren variaciones durante el desarrollo del folículo (30); están muy elevadas en el folículo secundario como consecuencia de la inducción de los enzimas encargados de la síntesis de progesterona (24) y de las aromatasas (31), que ocurre en este estadio del desarrollo folicular. Estos hechos se traducen a nivel subcelular en un aumento del contenido en retículo endoplásmico (representativo del incremento de 3 $\beta$ -HSD en ese orgánulo, que cataliza la conversión de pregnenolona a progesterona) y en la presencia de mitocondrias con crestas tubulares (reflejo de la síntesis elevada del complejo enzimático que convierte el colesterol a pregnenolona), características ambas de células secretoras de esteroides (28).

Si la aparición del antro define al folículo secundario morfológicamente, la aparición de receptores para LH (32,33) cuyo número aumenta en forma gradual a medida que avanza el desarrollo del folículo secundario, alcanzando el máximo en el folículo preovulatorio (hasta 40 veces el valor inicial) (24) constituye la característica funcional definitoria de la célula granulosa en esta fase de la foliculogénesis.

Asimismo aparecen, también por primera vez, otros receptores de membrana a la prolactina (34,35) y a prostaglandinas [ $PGE_2$  (36) y  $PGF_{2\alpha}$  (37)] (4).

Las células granulosa del **FOLICULO TERCARIO** se caracterizan por la existencia de cambios exclusivamente cuantitativos, aumentando los receptores a LH (34) y EGF (38), y disminuyen los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (20).

El proceso de diferenciación celular no se detiene aquí y, tras el pico de secreción hipofisaria de gonadotropinas y la ovulación, las células granulosa pasan a ser células luteinizadas o, simplemente, células luteales, variando su capacidad de respuesta a los estímulos hormonales y su producción esteroidea (24,39). Presentan variaciones cuantitativas en algunos de sus receptores con respecto a las células del folículo terciario: tienen un mayor número de receptores a PRL (34), EGF (38), lipoproteínas (19), y menor número de receptores a FSH (40,24) y LH (24,34) así como disminución, a la mitad del número de receptores, al GnRH (41).

## II.- HORMONAS Y AGONISTAS HORMONALES QUE DIFERENCIAN LA CELULA GRANULOSA OVARICA

La FSH y la LH, las dos hormonas gonadotropas hipofisarias, son las principales protagonistas de la diferenciación terminal de la célula granulosa. Entre las dos se reparten el peso de la regulación de un proceso en el que serán auxiliadas, no obstante, por un inacabable y variado número de agonistas.

### LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH)

El primer control endocrino de la célula granulosa durante la foliculogénesis lo realiza la FSH, que además mantendrá la dirección del proceso diferenciador hasta sus últimas fases. Los primeros receptores de FSH aparecen en el folículo primario (7). Tras la ocupación del receptor por la hormona se inicia un proceso de profundas transformaciones morfológicas que reflejan la aparición de cambios funcionales igualmente importantes.

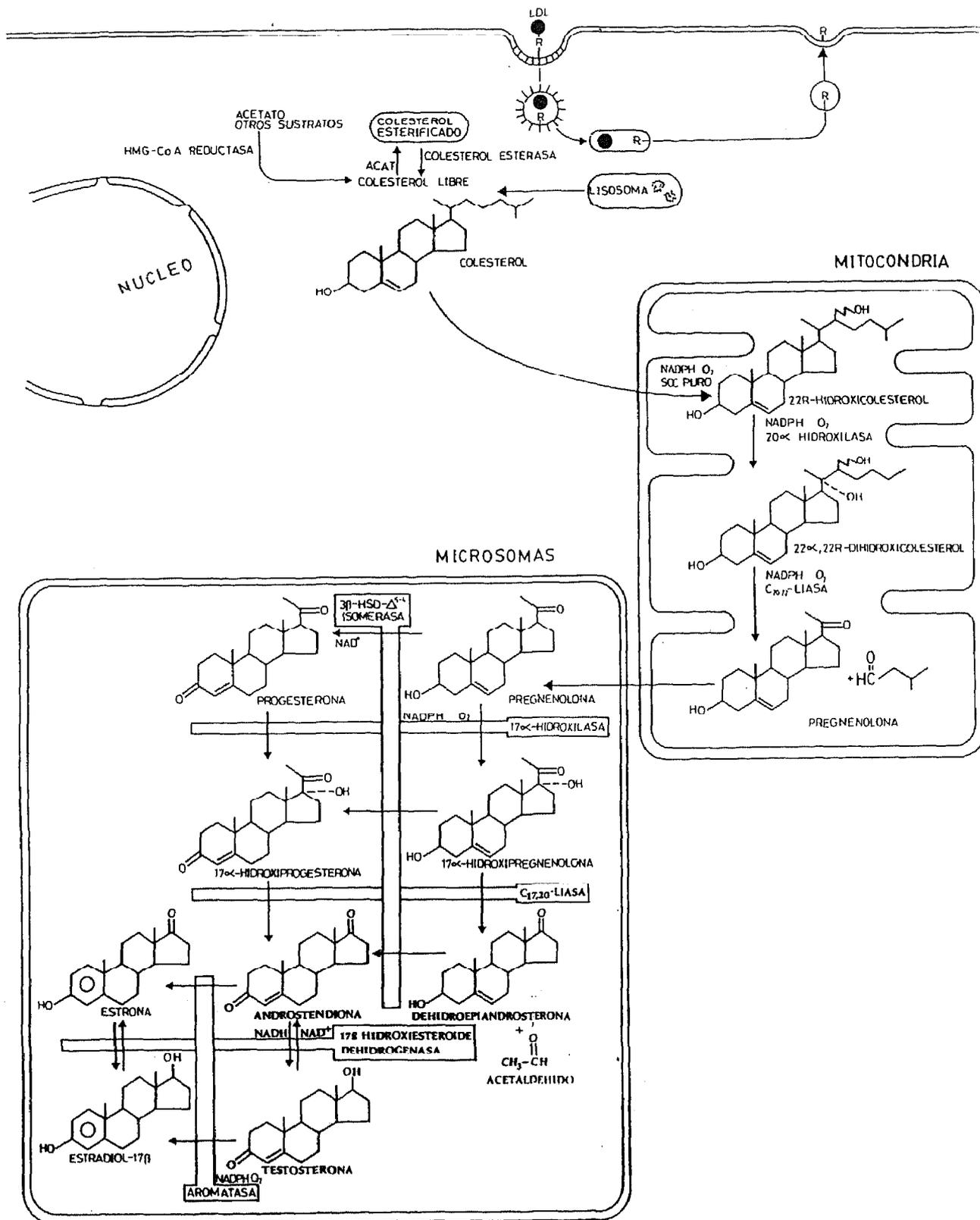
Los cambios morfológicos más relevantes incluyen la transformación del epitelio plano y liso en epitelio cuboidal con abundantes prolongaciones citoplasmáticas (42). Las células proliferan y sucesivas capas de células granulosa, entre las que se establecen numerosas uniones gap y de membrana, se superponen a la capa única existente en el folículo primordial, rodeando totalmente al oocito (4,43). La estructura y ultraestructura de la célula granulosa también se modifican (43). El citoesqueleto se altera, disminuyendo los haces de microfilamentos (44), y se visualizan cambios en el citoplasma compatibles con los de una célula con intensa actividad esteroideogénica.

Cuando se mantienen en cultivo primario células granulosa indiferenciadas, cuya proliferación se ha inducido con estrógenos en medios suplementados con FSH, pueden observarse cambios muy similares a los que ocurren en el folículo tras el tratamiento con FSH. Las células se hacen esféricas y se agregan y aumentan, al igual que "in vivo", los puentes intercelulares (43).

La función diferenciada más importante de las células granulosa es la de producir estrógenos, fundamentalmente estradiol, y progesterona. Las células granulosa son la principal fuente de estos esteroides durante el desarrollo folicular y, todas las transformaciones morfológicas relatadas, podrían posiblemente relacionarse con los cambios en la función de las células que induce la FSH.

Dos características morfofuncionales de la célula granulosa son especialmente importantes para comprender la cronología de su proceso de diferenciación y cómo la FSH participa en este proceso: a) el carácter avascular de la célula granulosa (6), que impide el abastecimiento de colesterol desde la sangre y hace obligada su obtención a través de la síntesis "de novo" y/o su captación del almacenado en la teca interna; b) la ausencia en la batería enzimática esteroidogénica, de la que está dotada la célula granulosa, del enzima C21-SCC P450 (17  $\alpha$ hidroxilasa, 17-20  $\alpha$ liasa) (45) (Gráfica 1).

Los dos estrógenos producidos por la célula granulosa, el estradiol y la estrona, empiezan a secretarse en grandes cantidades muy rápidamente después de que las cifras de FSH circulante se eleven o se administre FSH a células en cultivo (2). En ambos casos, el cambio bioquímico más importante que puede medirse en la célula es un aumento en la actividad de los enzimas que transfor-



GRAFICA 1

man androstendiona y testosterona en estrona y estradiol (46). La inducción temprana de las aromatasas por la FSH podría ser fundamental para el destino de un folículo concreto. Los estrógenos producidos como consecuencia de la activación de las aromatasas, amplifican casi todos los efectos biológicos de la FSH y, sólo en aquellos folículos que adquieren tempranamente tal posibilidad de amplificación, la diferenciación de las células granulosa contenidas en su interior se completaría con éxito (47,48); los demás, sufrirían atresia.

La androstendiona y la testosterona no son sintetizadas por la célula granulosa que, como ya se ha relatado, no posee C21-SCC P450 y es incapaz por tanto, de metabolizar la pregnenolona y la progesterona para producir andrógenos. Estos, son producidos en las células de la teca interna (49), y se acumulan en el folículo y la célula granulosa por un mecanismo aún desconocido.

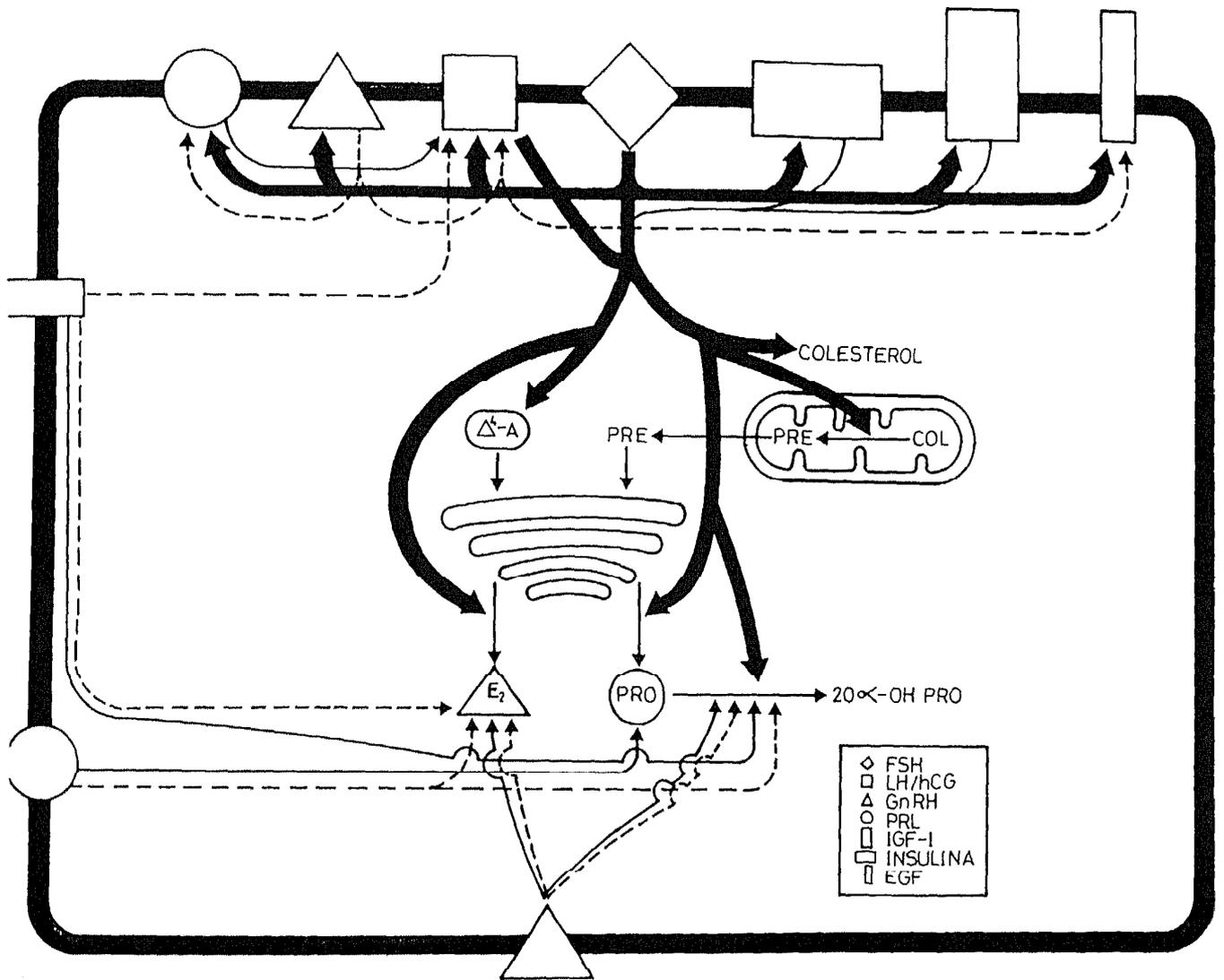
La transformación del colesterol en pregnenolona y de ésta en progesterona tiene lugar cuando actúan dos enzimas limitantes, uno mitocondrial, el enzima desramificante del colesterol P-450 (CSCC-P 450), que pasa el colesterol a pregnenolona, y otro microsomal, la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^{5-4}$  Isomerasa ( $3\beta$  HSD), que transforma la pregnenolona en progesterona. Ambas reacciones enzimáticas irreversibles son reguladas por la FSH (46,50). El segundo esteroide producido en grandes cantidades por la célula granulosa, la progesterona (Pro), empieza a sintetizarse más tardíamente que los estrógenos, también como consecuencia de la activación de la HMG-CoA reductasa, la CSCC-P 450 (52), y la  $3\beta$ -HSD (50), que la FSH induce en la célula granulosa. La progesterona así producida, puede ser metabolizada en la célula granulosa por la  $20\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $20\alpha$  HSD) a  $20\alpha$ -hidrox-preg-4-en-3-ona ( $20\alpha$ -OH-Pro), metabolito inactivo de la progesterona. La FSH previene esta inactivación, inhibiendo la actividad de la  $20\alpha$  HSD (53).

Además del aumento en la síntesis de esteroides, el otro gran cambio funcional que caracteriza la diferenciación de la célula granulosa es la aparición y/o el aumento de receptores hormonales.

La FSH aumenta el número y afinidad de sus propios receptores casi desde su primer contacto con la célula granulosa (33,54). Aumenta también el número de receptores a los estrógenos (23) que a su vez favorecen la captación ovárica de FSH (48), iniciándose con este efecto y el que tiene sobre la síntesis de estrógenos, una cascada amplificadora de la señal, que terminará con la luteinización de la célula granulosa. Para que ésta se produzca, es imprescindible un último acontecimiento: la aparición de receptores a LH/hCG (32,34,55), que tiene lugar, inducida por la FSH y amplificada por el  $E_2$  (33,55), en el folículo secundario o a las 24 horas de la adición de la hormona a las células mantenidas en cultivo.

La FSH también induce la síntesis de receptores a una amplia gama de agonistas hormonales que modulan sus propios efectos en la célula granulosa. Entre ellos los receptores a esteroides (andrógenos y progestágenos) (23), a factores de crecimiento como el SmC/IGF-I (12), el TGF $\beta$  (15), el EGF (56) y la insulina; a otras hormonas hipofisarias como la prolactina (PRL) (35), y mantiene los de péptidos similares a los hipotalámicos como el GnRH (57) (Gráfica 2).

La FSH regula además el metabolismo hidrocarbonado, aumentando la captación de glucosa y la formación de lactato (58), así como la actividad de la glucógeno fosforilasa (19). Aumenta el transporte de aminoácidos y la síntesis proteica, en general y de algunas proteínas específicas como la inhibina (59), que regula junto con los esteroides la secreción hipofisaria de de FSH (60), o



GRAFICA 2

el activador del plasminógeno tisular (tPA) (61) variedad del plasminógeno con actividad colagenasa, que disminuye la viscosidad del líquido folicular y produce lisis de la pared del folículo durante la ovulación (62).

### LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH)

La LH es la hormona responsable de la diferenciación terminal o luteinización de la célula granulosa. Su papel como hormona reguladora de este proceso está necesariamente subordinado al hecho que la célula granulosa indiferenciada no posee receptores para esta gonadotropina.

Como ha sido ya puesto de manifiesto, los receptores a la LH y a su análogo de origen placentario la hCG (hormona gonadotropina coriónica), se adquieren tarde en el proceso de diferenciación folicular (24), constituyen uno de los cambios funcionales que marcan la existencia de una diferenciación en la célula granulosa y, son inducidos por la FSH (55), y multiplicados por los estrógenos (63).

Así pues, una célula granulosa, y un folículo por tanto, sobre la que la LH actúa, es ya una célula granulosa y un folículo con una cierta predestinación a la luteinización y a la ovulación. Luteinización y ovulación que no tendrán lugar sin embargo, si la LH no actúa sobre el folículo y las células granulosa contenidas en su interior.

Bajo los efectos de la LH, las células granulosa sufren grandes cambios morfológicos, en algunos aspectos sólo cuantitativos con respecto a los indu-

cidos por la FSH, como son la pérdida definitiva de la apariencia fibroblástica (si la célula está siendo mantenida en cultivo), la formación de microvilli y una profunda reorganización del citoesqueleto (64).

En otros aspectos, los cambios son también cualitativos, y reflejan no sólo los cambios funcionales que están sucediendo en la célula, sino que ocasionalmente constituyen la señal para el inicio de alguno de dichos cambios. Las mitocondrias cambian la estructura de sus crestas a lameliforme-viliforme, y se agregan junto con los lisosomas en la región perinuclear (6,64), para facilitar así el movimiento de las grandes cantidades de esteroides que están siendo sintetizados por la célula. La proximidad entre las membranas de las distintas organelas implicadas en la síntesis, permite la formación de complejos enzimáticos asociados a las membranas, y una mayor movilidad de los sustratos que, por su carácter apolar, son difícilmente solubles en el medio acuoso que constituye el citoplasma celular.

Un retículo endoplásmico con un desarrollo máximo y la aparición de una gran cantidad de inclusiones lipídicas son otros de los cambios morfológicos inducidos por la LH, que reflejan cambios cuantitativos en la función.

La LH induce, por el contrario, una disminución de las uniones gap (65), lo cual permite una disgregación de las células granulosa y posibilitará la liberación del complejo cúmulo-ocitario en el momento de la ovulación (66). La desaparición progresiva de las uniones constituye además, la señal para la reanudación de la meiosis del oocito (67,68).

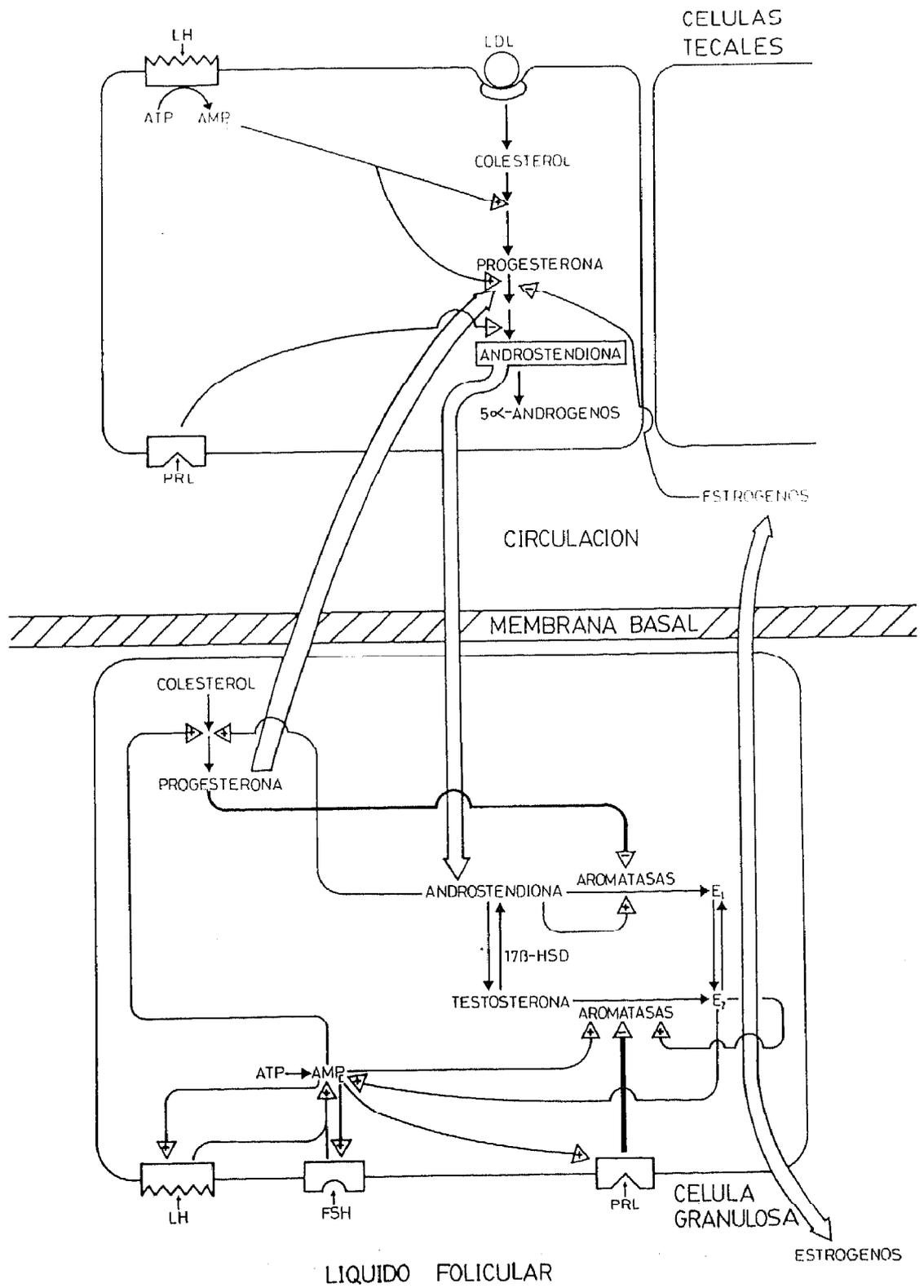
Además de los cambios morfológicos relatados (3), la LH posee efectos igualmente importantes sobre la función de la célula granulosa. Estimula la

esteroidogénesis folicular, especialmente la producción de progesterona (69), que constituirá el rasgo funcional dominante de la célula luteinizada. La síntesis de progesterona es promovida, aguda y crónicamente por la LH, quien estimula la actividad de HMG-CoA reductasa, lo que conlleva un aumento en la disponibilidad del sustrato sintetizado "de novo" (70); también aumenta la actividad de la colesterol esterasa citoplasmática, lo que permite obtener colesterol del almacenado en forma esterificada (71), y, finalmente, aumenta la síntesis y/o activa proteínas transportadoras de esteroides, todo lo cual constituye un estímulo rápido de la producción de progesterona.

Al contrario que la FSH, que sólo induce o activa los enzimas implicados en la síntesis de progesterona, la LH induce la síntesis de la P450 SCC (71, 72) y la  $3\beta$ -HSD (73,74), generando de esta forma el mecanismo que permitirá mantener las altas cifras de progesterona que producen la célula luteinizada y el cuerpo lúteo.

En contraste con sus efectos sobre la síntesis de progesterona, la LH sólo tiene un papel de mantenimiento y potenciación de los efectos de la FSH sobre la producción de  $E_2$  (69). Aumenta la síntesis de andrógenos en células tecales (75), lo cual constituye un mecanismo indirecto de potenciación de la síntesis de  $E_2$  al proporcionar así a la célula granulosa el sustrato aromatizable (76). También actúa directamente sobre la síntesis, manteniendo la actividad de las aromatasas inducida por la FSH (69).

Los efectos de LH en célula granulosa son, en todos los casos, amplificados por la adenosina (77) e incluyen, además de los anteriormente descritos, otros con menos significado para la célula granulosa pero muy importantes para el éxito de la función folicular fundamental, la ovulación. Entre ellos se en-



TEORIA DOS CELULAS DOS GONADOTROPINAS

cuentran el aumento inducido por la LH de la síntesis por la célula granulosa de algunas proteínas como la inhibina (59), la relaxina (78) y el activador del plasminógeno (61,62); el estímulo de la producción de prostaglandinas (67), y la disminución de la producción del inhibidor de la maduración del oocito (OMI) (68,79).

### LA PROLACTINA (PRL)

Los efectos de la prolactina a nivel gonadal, y más concretamente a nivel de la célula granulosa ovárica, han sido hasta el momento mal estudiados y son frecuentes los datos contradictorios en cuanto a su papel en la regulación de la función ovárica. Por este motivo, y porque su órgano blanco más obvio (la mama) es otro, no ha sido nunca considerada como una gonadotropina. Sin embargo, no es discutible que la prolactina debe actuar, al menos, como modulador de los efectos reguladores de las dos gonadotropinas.

La prolactina se encuentra en el fluido folicular en una concentración mayor que la plasmática (4), lo que hace pensar en la existencia de un mecanismo activo de transporte de la prolactina sérica o alternativamente en su síntesis local por el ovario (80). En cualquiera de las dos eventualidades, su elevada concentración en el líquido folicular unido a la existencia, ya mencionada, de una inducción de sus receptores en célula granulosa por FSH (35), sugieren muy intensamente que su participación en la regulación de la función de la célula granulosa es importante.

En células granulosa obtenidas de folículos pequeños, con bajo grado de diferenciación, la prolactina inhibe la producción de progesterona (81). Por

el contrario, en presencia de FSH y en células granulosa en estadios terminales de diferenciación, la PRL aumenta la producción de progesterona (35, 81-83), elevando la captación de colesterol (81), la actividad de la colesterol esterasa, y la síntesis "de novo", y estimulando por tanto, indirectamente, la síntesis del precursor de la progesterona, la pregnenolona (19) también activa el enzima (la  $3\beta$ -HSD) que la convierte en progesterona (84) e inhibe el enzima  $20\alpha$ -HSD que degrada a la hormona (37).

En contraste con sus efectos sobre la síntesis de progesterona, la prolactina deprime la actividad basal y FSH-inducida de las aromatasas, reduciendo por tanto la síntesis de  $E_2$  por la célula granulosa independientemente de su grado de diferenciación (85).

Otros efectos observados para la prolactina en células granulosa diferenciadas incluyen, la inducción y el mantenimiento de receptores a la LH (86, 87), el mantenimiento de la fluidez de la membrana (y por tanto de la accesibilidad de los receptores en ella ubicados) y el aumento en la síntesis de relaxina y de OMI. Todos ellos cambios funcionales que reflejan la luteinización de la célula granulosa. Por último, la prolactina produce cambios en la forma y estructura de la célula (paso de aplanada a esférica, reorganización del citoesqueleto, aumento del número de microvilli) (3) que reflejan asimismo su importancia como inductora de la luteinización.

La mayoría de los efectos descritos son bifásicos y dependen del grado de diferenciación de la célula y de los niveles de la hormona (82,83). Esta característica es común a varios de los agonistas hormonales con acciones reguladoras a nivel de la célula granulosa, como se pondrá de manifiesto a lo lar-

go de esta introducción. Los mecanismos que subyacen en este carácter bifásico, y aparentemente contradictorio, de algunos de los moduladores de la proliferación y diferenciación de la célula granulosa constituyen, todavía, uno de los más intrigantes misterios acerca de su funcionamiento. En su esclarecimiento se encuentra, probablemente, la respuesta al gran interrogante de la fisiología ovárica, porqué las células granulosa de algunos folículos proliferan y se diferencian a luteales y otras fracasan en el intento.

Además de las hormonas polipeptídicas de origen hipofisario existen otros agonistas hormonales de naturaleza peptídica, que en la gran mayoría de los casos podrían estar siendo producidos por el ovario y serían responsables de la regulación/modulación paracrina/autocrina de la proliferación y diferenciación de la célula granulosa.

Entre los factores que actúan potenciando la proliferación y/o diferenciación de la célula granulosa se encuentran la insulina, los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs), el TGF  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) y el factor de crecimiento plaquetario (PDGF).

Por el contrario, otros péptidos como el GnRH, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el TGF $\alpha$ , son francamente inhibidores de la diferenciación celular en estas células.

Los efectos concretos que en la función de la célula granulosa poseen ambos grupos de hormonas o agonistas hormonales se describen a continuación.

LA INSULINA Y EL IGF-I

La insulina y el IGF-I potencian el efecto estimulador de las gonadotropinas en la diferenciación de la célula granulosa, incluyendo la producción de progesterona y estrógenos, y la formación de receptor LH.

Algunos de los mecanismos de acción de la insulina en la célula granulosa se corresponden con sus efectos no específicos, con sus acciones clásicas en el metabolismo celular: el transporte de glucosa, la captación de aminoácidos, o la síntesis de ADN (88). Estos efectos suponen una mejora de la viabilidad celular y consecuentemente un aumento de la esteroidogénesis. Sin embargo, la insulina tiene efectos directos en la esteroidogénesis realizando una activación específica de las enzimas esteroidogénicas (19).

En ausencia de otro agonista, favorece la multiplicación celular (89) (no detectable en células granulosa de rata puesto que no proliferan en cultivo); aumenta la formación de uniones gap (3) y el desarrollo del retículo endoplásmico liso y rugoso y el aparato de Golgi (3,6), pero no afecta la ultraestructura de las mitocondrias ni el contenido en receptor LH (ayuda a su mantenimiento, pero no modifica su número); aumenta ligeramente la producción de progesterona [favorece la captación de LDL (90), aumenta la síntesis de pregnenolona -estimula a la P450 SCC- (91) y la actividad  $3\beta$ -HSD (89) y  $20\alpha$ -HSD] y disminuye la síntesis de fibronectina (89,92), indicadores ambos del grado de diferenciación celular, pero sin modificar la actividad aromatasa (89). La FSH sola, favorece el desarrollo de mitocondrias y retículo endoplásmico liso y la formación de microvilli, con una gran elevación en la síntesis de progesterona y la formación de receptor LH.

El tratamiento combinado con insulina y FSH incrementa marcadamente la formación de uniones gap y microvilli (3) y aumenta el desarrollo del SER y complejo de Golgi respecto del producido por cada hormona por separado. Además el tratamiento combinado, produce mitocondrias mayores con crestas tubulares (3). Congruentemente con las modificaciones morfológicas, el tratamiento conjunto aumenta de modo significativo la secreción de progesterona (93) y estrógenos (estimula la actividad aromatasas) (94) y la formación de receptor LH (95).

Puesto que la insulina puede unirse a los receptores a IGF-I (de estructura similar al de la insulina) no está claro si la transformación morfológica inducida por la insulina está mediada por sus propios receptores o por los de IGF-I. Aunque los IGFs pueden reaccionar en forma cruzada, entre sí y con la insulina en estudios de receptor de superficie, los IGFs básicos y neutros se unen preferentemente a receptores tipo I y II respectivamente (12). Por otra parte, los niveles de insulina en el líquido folicular tienden a ser menores que los de IGF-I y, generalmente, son demasiado bajos para activar el receptor de alta afinidad de insulina; además, los efectos de la insulina descritos, tienen lugar a concentraciones  $\mu\text{M}$ , muy superiores a las fisiológicas [ $\text{nM}$ ] y su efecto máximo no es aditivo con el del IGF-I, sugiriendo que insulina e IGF-I utilizan una vía común y saturable y la posibilidad de que los IGFs, más que la insulina, puedan ser los fisiológicamente relevantes en la regulación de la función ovárica (96).

La SmC/IGF-I produce, a concentraciones nanomolares, una respuesta mitogénica y diferenciadora (89) potente en células granulosa de folículos pequeños cultivadas en medio libre de suero, estimula ligeramente la síntesis de

pregnenolona, progesterona (97) y 20 OH-Pro (aumenta la utilización de HDL y LDL) y no modifica la actividad aromatasas. Su papel mitogénico es particularmente atractivo, puesto que puede tener una gran importancia en el crecimiento folicular autocrino (independiente de gonadotropinas) durante el período infantil.

En presencia de FSH aumenta la producción de progesterona (estimula P450 SCC y  $3\beta$ -HSD) y 20 OH-Pro (96), y estrógenos (potencia la inducción de la actividad aromatasas) (98) producidos por la FSH (12) (mimetiza a la insulina, aunque su efecto es mayor), al aumentar las actividades de los enzimas biosintéticos de esteroides, de forma independiente a sus efectos promotores del crecimiento (96). De manera similar, el IGF-I sinergiza con  $17\beta$  estradiol elevando la síntesis de progesterona y pregnenolona (99).

En la célula granulosa se produce también el efecto clásico del IGF-I como factor de sulfatación. El IGF-I aumenta la producción y secreción de proteoglicanos sulfatados en células tratadas o no con FSH (100,101). También aumenta la producción de inhibina, tanto solo como en presencia de FSH (102). Finalmente, IGF-I sinergiza con FSH en la inducción de receptores LH en forma tiempo y dosis dependiente (103).

El potencial sinérgico de IGF-I no se limita a la FSH; también aumenta la acumulación de progesterona y AMPc estimulada por hCG y  $\beta_2$  adrenérgicos, pero no la producida por PRL (12). Esto sugiere que el papel del IGF I no está limitado a la maduración folicular inicial, sino que modula también a los agentes luteotrópicos y  $\beta$  adrenérgicos implicados en la iniciación y mantenimiento del cuerpo lúteo (96).

Se ha demostrado la producción local de los IGFs en las células granulosa (104), que aumenta tras estimulación con gonadotropinas (105), EGF (106), estrógenos y hormona de crecimiento (GH) (107); y la existencia de lugares de unión específicos (a través de los cuales ejercen su acción) (96), cuyo número aumenta en respuesta a la FSH (100), LH,  $\beta$ -adrenérgicos (96), y agonistas para la generación de AMPc (12), pero no a PRL (96); este efecto de la FSH puede ser amplificado por la GH (100), e inhibido por el GnRH (100). Se precisa de la presencia de la FSH para el mantenimiento de los receptores inducidos; alternativamente la LH puede hacerlo, pero con una eficacia menor, mientras que la prolactina tiene escaso o nulo efecto (100).

#### EL PDGF Y EL TGF $\beta$

El factor de crecimiento plaquetario (PDGF) es almacenado en los gránulos alfa de las plaquetas, se libera durante la formación del coágulo y puede estar implicado en procesos de reparación celular (108). Posee dos componentes con actividades diferentes; el P60-PDGF principalmente mitogénico, y el TGF $\beta$ , sintetizado también por las células granulosa y tecales, que tiene actividad mitogénica y diferenciadora (incrementando la acción de la FSH). Actúa en los estadios tempranos del desarrollo y, probablemente, en la diferenciación terminal de las células granulosa durante la fase de corpus hemorrhagicum en el que está aumentada su concentración (108).

El TGF $\beta$  potencia la diferenciación inducida por la FSH, y aumenta la actividad aromatasas FSH-estimulada (109). Favorece la unión de LH a la célula granulosa, aumenta el número de receptores a LH (110), dependiendo de la concentración de FSH presente (111), e inhibe la acción mitogénica del EGF (112).

EL GnRH

Como es suficientemente conocido, el GnRH es un decapeptido producido en el hipotálamo y vertido, a través del sistema porta, a la hipófisis anterior en la que regula la síntesis y secreción de gonadotropinas hipofisarias.

Los efectos del GnRH a nivel gonadal han sido extensamente demostrados (113). Es sin embargo dudoso y poco probable, que estos efectos puedan atribuirse al péptido de origen hipotalámico. Parece obvio que éste nunca alcanza, debido a su escaso paso a la circulación general y a su rápida degradación, niveles en plasma que permitan explicar sus efectos periféricos. A pesar de ello, no es menos obvio, que la célula granulosa posee receptores al GnRH (10), y que existen evidencias de la producción local en el ovario, de un péptido de estructura y funciones similares al hipotalámico (114).

El GnRH ejerce sus acciones gonadales a través de sus receptores de membrana con una especificidad y afinidad similar para el GnRH y sus análogos que los receptores GnRH de la hipófisis anterior. El número y afinidad de los receptores no varía de forma sustancial durante el día, la fase del ciclo o la hipofisectomía (41). Sin embargo, la FSH es necesaria para mantener el contenido de receptor GnRH en las células granulosa y el GnRH regula su número, aumentándolo o disminuyéndolo, según la dosis y el tiempo de tratamiento (41). Una exposición constante al péptido hace descender el número de receptores, debido a internalización y degradación posterior del complejo hormona-receptor, lo cual se traduce en una desensitización del tejido.

El GnRH y sus análogos sintéticos, tienen en la célula granulosa y en general en el folículo ovárico, un efecto bifásico cuyo signo, estimulador o in-

hibidor, depende del estado de maduración celular, la presencia simultánea de otros reguladores (ej. gonadotropinas), la cronología de administración "in vivo" o "in vitro" y la duración de la exposición. Añadido a cultivos de células granulosa, durante las fases iniciales de la diferenciación inducida por FSH, interfiere y previene casi todos los cambios morfofuncionales característicos de la diferenciación que son generados por la gonadotropina (43).

Las células tratadas con el péptido no se agregan; su forma continúa siendo alargada y de apariencia fibroblástica, a pesar de la presencia de FSH, y no desarrollan los microvilli ni las uniones gap que caracterizan a la célula granulosa diferenciada (6,43).

La producción de estradiol y progesterona no se inicia o se interrumpe como consecuencia de la inhibición que el GnRH realiza a nivel de las aromatasas (115),  $3\beta$ -HSD (50) y posiblemente de la P450 SCC (87,116). Además, activa a la  $20\alpha$ -HSD (117). El GnRH previene también la inducción de receptores a LH (43,115) y PRL (87) y la formación de receptores a EGF (14). Disminuye además el número y/o la afinidad de la FSH por su receptor (87).

Administrado "in vivo", disminuye la ganancia de peso FSH inducida (118), y cuando se tratan ratas en período preovulatorio con un anticuerpo frente al GnRH, aumenta el número de folículos que completan la ovulación y el número de cuerpos lúteos presentes en el ovario (118).

Todas estas evidencias colocan al GnRH de origen gonadal en un puesto importante como candidato al papel de responsable de la atresia folicular.

Los efectos directos del GnRH a nivel gonadal no están limitados como ya se ha sugerido a la inhibición (113). Administrado a células granulosa en ausencia de agentes diferenciadores (FSH o análogos del AMPc), induce la actividad de las aromatasas y por tanto la síntesis de estrógenos (19). Es capaz de estimular la P450 SCC y la síntesis de pregnenolona (119), y aumenta ligeramente la actividad de la  $3\beta$ -HSD (50) y de la  $20\alpha$ -HSD, lo que conduce a progresivos aumentos en la cantidad de progesterona (50,119) y  $20\alpha$  OH Pro (117,120) sintetizadas por las células (50,119). También estimula la síntesis proteica, especialmente de fibronectina y tPA (121) y la de prostaglandinas (122) y lactato (113).

Administrado "in vivo", mimetiza la acción luteinizante de la LH y sus efectos sobre la ovulación (121), probablemente más por sus efectos sobre la síntesis de prostaglandinas y activador del plasminógeno, que por su efecto directo sobre el proceso ovulatorio (121,122).

#### EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO Y EL TGF $\alpha$

La célula granulosa posee receptores al EGF (13,56); los estudios iniciales de Gosparowicz y col. (123,124) demostraron la actividad mitogénica del EGF "in vitro" en células granulosa de varias especies, con la excepción de la rata (que posee una limitada capacidad replicativa en cultivo) (125), y la promoción del crecimiento del folículo que produce.

Además de su acción mitogénica, afecta las funciones diferenciadas de la célula, incluyendo el desarrollo del receptor LH y la esteroidogénesis. El EGF

suprime los receptores a LH, FSH inducidos (110,126); inhibe, en forma dosis dependiente, la producción de estrógenos estimulada por la FSH: deprime la actividad aromatasa basal y FSH-estimulada (126), además de disminuir el sustrato disponible al inhibir la producción de andrógenos en la teca. El EGF disminuye también la síntesis de inhibina y OMI, estimulando la maduración del oocito (127).

En contraste, parece ejercer efectos estimulatorios en la síntesis de progesterona basal y FSH estimulada (13,126) al aumentar la producción de pregnenolona y la actividad  $3\beta$ -HSD, aumenta también la actividad del enzima  $20\alpha$ -HSD y, por tanto, la producción de  $20\alpha$  OH-Pro (13). Estimula, asimismo, la síntesis de ADN y proteínas (11) [ej tPA (128)].

El EGF ejerce su acción por un mecanismo mediado por su receptor (13, 126). La FSH, pero no la LH ni la prolactina, aumenta el contenido en receptores a EGF (14); a su vez el EGF incrementa la unión de FSH a su receptor (129), de ahí que su acción esté coordinada con el resto de los eventos hormonalmente dirigidos. El patrón general de las acciones diferenciadoras del EGF recuerda las acciones del GnRH, que inhibe la inducción de receptores a EGF por la FSH.

EGF y FSH pueden interactuar en la regulación de la célula granulosa a dos niveles:

- 1) por regulación de las interacciones ligando-receptor (EGF aumenta la unión de FSH a su receptor, FSH aumenta el número de receptores a EGF)
- 2) por regulación de la función de la célula mediada por el ligando: EGF modula la diferenciación mediada por FSH, FSH modula la proliferación estimulada por EGF.

---

El TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ ), análogo estructural del EGF y capaz de unirse al receptor común TGF $\alpha$ /EGF, atenúa también la síntesis de estrógenos FSH-inducida (130).

### III.- TRANSMISION DE LA SEÑAL HORMONAL

Una de las funciones más importantes de la membrana plasmática es recibir los mensajes extracelulares y transducirlos en señales intracelulares que activen las respuestas adecuadas. Definir la naturaleza de esta función de transducción, particularmente la naturaleza y número de los mensajeros intracelulares involucrados en la activación celular es de gran importancia en el desarrollo del entendimiento de la función de la célula.

La transferencia de las señales hormonales desde el exterior al interior de la célula es realizada por un "segundo mensajero" generado en respuesta a la unión hormona-receptor en la membrana, que transmite y amplifica la información. La mayoría de los receptores de membrana se encuentran acoplados a uno o más de los siguientes sistemas de transducción de señales:

1) El sistema adenilil ciclasa (AC), cuya activación genera AMPc, el cual a su vez activa una serina-treonina proteína quinasa, la Proteína quinasa A (PKA).

2) La hidrólisis de fosfolípidos de membranas, especialmente los fosfolípidos de inositol, que generan al menos dos tipos de segundos mensajeros: el inositol 1,4,5 trifosfato ( $IP_3$ ), que moviliza  $Ca^{++}$  de los almacenes intracelulares, y el diacilglicerol (DAG) que activa una proteína quinasa, la Proteína quinasa C (PKC).

3) La entrada de  $Ca^{++}$  a través de canales operados por mediadores químicos que se generan tras la interacción entre el ligando y el receptor, o canales dependientes de los cambios de potencial de reposo de la membrana.

4) Receptores en los que alguno de sus dominios presenta actividad de proteína quinasa - tirosina quinasa.

En agudo contraste con la amplitud de conocimientos adquiridos en la última década acerca de los numerosos agonistas, y de la multitud de mecanismos endo, para y autocrinos que colaboran en la regulación de la diferenciación folicular, existen grandes lagunas en la comprensión de la transmisión de las señales reguladoras en el interior de la célula.

Algunos de los hechos probados, y la mayoría de los interrogantes planteados acerca de la mediación intracelular de los efectos biológicos de las principales hormonas o agonistas que regulan la proliferación y diferenciación de la célula granulosa, se describen seguidamente (Gráfica 3):

#### HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH)

El receptor de FSH se encuentra acoplado a adenilil ciclasa (131,132). Tras la unión de la hormona con el receptor al ser aplicada a un cultivo de células granulosa, resulta un incremento en la actividad del enzima, que empieza a ser significativo tres horas después de la unión. Aproximadamente al mismo tiempo, pueden detectarse aumentos en la cantidad de AMPc citoplasmático (131). La activación de la adenilil ciclasa por FSH en célula granulosa tiene lugar, presumiblemente, en una forma no diferente de la descrita clásicamente para otros receptores acoplados a adenilil ciclasa. Muy brevemente, el complejo FSH-Receptor interactúa con la Gs catalizando, en un proceso dependiente de magnesio, la sustitución del GDP unido a la subunidad  $\alpha$ , por GTP. Tras la hi-

drólisis de éste último, la proteína se disociaría en dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  activaría a la subunidad catalítica del complejo adenilil ciclase, que transformaría ATP en AMPc (133,134). La existencia de ADP-ribosilación en respuesta a la toxina colérica, como prueba adicional de que la activación de la Gs se está produciendo, no ha sido probada en célula granulosa ovárica. Sin embargo, la toxina del Vibrio cholerae (43,135) al igual que otro activador de la Gs, el FNa (136), reproducen, parcial o totalmente, los efectos biológicos de la FSH.

El aumento del contenido intracelular del AMPc tras el estímulo de la Gs con Ctx o FNa, de la subunidad catalítica con Forskolín (137,138) o la aplicación de análogos semisintéticos no metabolizables como el (Bu)<sub>2</sub>AMPc (139) o el Br AMPc (43), es capaz de inducir la diferenciación de la célula granulosa, y de reproducir la mayoría de los efectos biológicos de la FSH:

- \* cambios morfológicos (43,139,140)
- \* luteinización y producción de pregnenolona y progesterona (115,139)
- \* Producción de estrógenos (135), tPA (62) e inhibina (102)
- \* Inducción de receptores a LH (43,141), PRL (140) y GnRH y aumento de receptores a FSH (140,142), EGF (14) e IGF-I.

El incremento en la cantidad de AMPc intracelular producido por la FSH no depende sólo de su acoplamiento con la Gs de la adenilil ciclase, sino también de la inhibición  $Ca^{++}$  dependiente que la hormona ejerce sobre la actividad fosfodiesterasa de AMPc de membrana (143,144). La inhibición química del enzima con 3-metil-isobutil-xantina (MIX) (145,146), también es capaz de reproducir los efectos diferenciadores de la FSH.

Tras la exposición continuada a la FSH, la adenilil ciclasa se desensibiliza, y disminuye la producción de AMPc en respuesta a la hormona (147). Este es un proceso reversible que podría deberse a una alteración en la interacción receptor proteína G, al igual que sucede en otros tejidos.

El papel de otros nucleótidos como el GMPc, en la señalización intracelular de los efectos de la FSH, está poco documentado, y las evidencias existentes son contradictorias (148,149). La FSH induce un aumento en la síntesis de GMPc (150), pero los efectos estimulatorios de los análogos sintéticos de éste, sobre la incorporación de timidina al ADN, y la esteroidogénesis, están ligados a la utilización de determinadas dosis del análogo, obteniéndose efectos paradójicos con el aumento de dichas dosis (151).

La mayoría de los efectos de la FSH sobre la esteroidogénesis son  $Ca^{++}$ -calmodulina dependientes (152). Los antagonistas del  $Ca^{++}$  (Verapamil, manganeso, cobalto y EGTA) y de la calmodulina (Trifluoperazina y R24571), inhiben la estimulación de la síntesis de esteroides inducida por FSH (153). Los efectos del calcio tienen lugar modulando los enzimas que sintetizan y degradan AMPc (AC y PDE) (154,155), y también en alguna etapa bioquímica, desconocida por el momento, pero distal en la cascada de producción de AMPc (156,157).

No existe una hipótesis aceptable acerca del modo en que la FSH movilizaría el calcio, para aumentar sus cifras libres intracitoplasmáticas (158,159). La FSH no hidroliza fosfoinositósidos y, por lo tanto, no tendría acceso a los almacenes intracelulares de  $Ca^{++}$ . Tampoco ha podido demostrarse hasta el presente la existencia de canales de  $Ca^{++}$  en la membrana de la célula granulosa, susceptibles de ser activados tras la unión de la FSH a su receptor. Sin em-

bargo, el aumento de las cifras de potasio extracelular, y la utilización de ionóforos como el A23187 o de agonistas de los canales como el BAY K, activan la esteroidogénesis basal o potencian la inducida por FSH (153). Así pues, la participación del  $\text{Ca}^{++}$  en el sistema de señales que transmiten los efectos de la FSH en la célula granulosa ovárica está probada (160). Sin embargo, la forma en la que la FSH utiliza el  $\text{Ca}^{++}$  está aún sujeta a grandes interrogantes, en oposición al amplio conocimiento existente acerca de la mediación por el AMPc.

#### HORMONA LUTEINIZANTE (LH)

Al igual que el receptor de FSH, el receptor de LH se encuentra acoplado a adenilil ciclase, y de la interacción Hormona-Receptor (H-R) resulta un aumento del AMPc citoplasmático (131,132). En coherencia con este hecho, el FK y el  $(\text{Bu})_2$  AMPc reproducen los efectos de la LH sobre la producción de progesterona (138,161). Sin embargo, el AMPc no estimula la síntesis de pregnenolona en mitocondrias aisladas de folículos de cerdo, lo que sugiere que en la estimulación de la esteroidogénesis por la LH/hCG puede estar implicado el aumento selectivo de AMPc en diferentes compartimientos celulares.

El AMPc actúa sobre una Proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) para producir activación de proteínas específicas de la esteroidogénesis mediante su fosforilación. Además, la polimerización y actividad de los microfilamentos puede ser modificada por la PKA (64) lo que favorece el transporte del colesterol hacia la mitocondria, de la pregnenolona fuera de la mitocondria y/o la internalización y transporte de los receptores a LDL a los lisosomas. El AMPc

podría estar directamente implicado en la respuesta crónica a la LH/hCG, en mantener la morfología de la célula luteal y los componentes intracelulares necesarios para la síntesis y secreción de esteroides debido a sus efectos sobre los microtúbulos (162). En contraste con la FSH, la LH/hCG no afecta la actividad de la Fosfodiesterasa del AMPc (144).

El AMPc no es el único segundo mensajero de la LH identificado en la célula granulosa ovárica. El  $\text{Ca}^{++}$  parece jugar también un papel importante en la esteroidogénesis inducida por LH (152,153). El  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta significativamente la biosíntesis de Progesterona (153) actuando sobre: la acumulación de AMPc LH-estimulada (154,163), y en un lugar intracelular distal a la generación de AMPc (156,157). Además modula positivamente la estimulación por la LH de la biosíntesis de Pregnenolona desde el colesterol endógeno. Todas ellas son acciones calmodulina dependientes (152,153).

La LH es capaz de estimular el eflujo de  $^{45}\text{Ca}^{++}$ , de la célula granulosa cargada previamente, de una forma bifásica: pocos segundos después de la unión de la hormona con el receptor se produce una movilización del "pool" mitocondrial, y más tardíamente hay una nueva movilización a expensas de almacenes no mitocondriales (164).

La LH aumenta el recambio de fosfoinosítidos (165) e hidroliza muy rápidamente el TPI liberando  $\text{IP}_3$ . Como es ya conocido, el inositol 1,4,5, trifosfato, es capaz de movilizar  $\text{Ca}^{++}$  de almacenes intracelulares (166). Dada la rapidez con la que la LH hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato en célula granulosa ovárica, parece probable que la fase rápida de la movilización de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por la LH sea debida a la presencia de  $\text{IP}_3$ . En cuanto a la

fase lenta, puede ser reproducida con forskolin y análogos sintéticos del AMPc; por tanto, debe ser dependiente del AMPc generado tras la unión de la LH con aquellos de sus receptores que se encuentran acoplados a adenilil ciclase.

### PROLACTINA

El mecanismo de acción de la PRL a nivel ovárico, al igual que el que media sus efectos en otros órganos blanco, no ha sido aún elucidado excepto por exclusión.

La prolactina no estimula la producción de AMPc, y se sabe que su lugar de acción en la inhibición de la secreción de estrógenos ocurre, al menos en parte, distal a la adenilil ciclase, puesto que inhibe también la acción estimuladora del  $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$  (167). Tampoco ha podido demostrarse que el receptor de prolactina esté acoplado a la hidrólisis de fosfolípidos de inositol, ni que induzca cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  libre citoplásmico.

### INSULINA E IGF-I

El mecanismo de acción de la insulina en célula granulosa ovárica, al igual que en los demás tejidos, es todavía y en gran medida una incógnita. La mayoría de los efectos metabólicos y estimulatorios del crecimiento de la insulina, se consiguen por regulación del estado de fosforilación de residuos serina y treonina de proteínas estructurales y enzimas limitantes. En la célula granulosa, como en otros tejidos, la insulina no es capaz de activar ningun-

no de los sistemas de mensajeros (AMPC, fosfolípidos de inositol, movilización de calcio) acoplados con serina/treonina quinasas. Como es conocido, la única proteína quinasa acoplada a la insulina es la que forma parte de su receptor, cuya actividad es de tirosina quinasa (168). Recientemente, se ha sugerido que ciertos fosfatidilinositol glicanos presentes en las membranas podrían ser los precursores del largamente perseguido segundo mensajero de la insulina (169-172). De estar presentes en la célula granulosa uno de estos PI-G, podría asimismo ser el responsable intracelular de los efectos de la insulina en esta célula.

La acción sinérgica del SmC/IGF-I con FSH se ejerce, al menos en parte, en lugar(es) proximal(es) en la generación de AMPC (173). El IGF-I solo no aumenta la acumulación de AMPC, pero en presencia de FSH eleva la acumulación estimulada por ésta en forma tiempo y dosis dependiente (la insulina posee un efecto similar), e induce varias funciones de la célula granulosa dependientes del AMPC. Además, ejerce su efecto sinérgico con otros agonistas de la célula granulosa para los que el AMPC es su segundo mensajero (hCG,  $\beta_2$ adrenérgicos). No tiene efecto a nivel del receptor de FSH (173); no tiene efecto en el mantenimiento del receptor a FSH, sino a nivel del complejo de la adenilil ciclasa, aumentando su actividad (amplifica la acción del forskolin), no se sabe si actuando a nivel de la subunidad reguladora (Gs o Gi) o de la catalítica. También es posible que implique alteración de la actividad fosfodiesterasa así como un lugar de acción post-AMPC (173) (ejerce un potente efecto estimulatorio en la acción del AMPC reflejada en un aumento de la síntesis de progesterona producida por  $Bu_2AMPC$  (173):

a nivel de la subunidad regulatoria de la proteína quinasa tipo II dependiente de AMPC

a un nivel más distal en la cascada de trasducción. Sus efectos estimuladores son inhibidos por la cicloheximida o la actinomicina D, indicando que se requiere de la síntesis proteica y de ARN para la plena expresión de los efectos diferenciadores de la SmC/IGF-I. Además aumenta los efectos de concentraciones máximas de efectores no dependientes de AMPc, como los estrógenos (174).

### PDGF Y TGF $\beta$

La potenciación que realiza el TGF $\beta$  de la FSH en la célula granulosa, tiene lugar, al menos parcialmente, a través de un aumento de la producción del AMPc inducida por la gonadotropina (140). Sin embargo deben estar implicados otros mecanismos, puesto que el TGF $\beta$  amplifica la inducción, de receptores a LH y la producción de progesterona por la FSH más que la debida a la elevación producida en AMPc. Además tiene poco efecto sobre la producción de AMPc debida a Ctx o FK, y no obstante, aumenta su producción de receptores a LH (111).

### GnRH

En célula granulosa ovárica, el GnRH previene la acumulación de AMPc inducida por FSH, pero no altera las cifras basales (150). El mecanismo por el cual el GnRH es capaz de disminuir el AMPc y contrarrestar, de esta forma, los efectos diferenciadores del nucleótido, y de la FSH en consecuencia, se conoce sólo parcialmente.

El GnRH inhibe la actividad de adenilil ciclasa estimulada por FSH (175); sin embargo, tal inhibición no está mediada por un acoplamiento del péptido con la Gi (176), ni por modificación de la activación de la subunidad catalítica por Gs (176). La activación máxima de la Gs o de la subunidad catalítica de la adenilil ciclasa con toxina colérica o con diterpeno forskolín, no son capaces de vencer los efectos inhibitorios del péptido sobre la esteroidogénesis o la inducción de receptores a LH (140), por lo que difícilmente puede ser la inhibición de la adenilil ciclasa el mecanismo de acción del GnRH. La disminución de la actividad del enzima generador de AMPc, existe sin embargo, y debe ser atribuída más a una disminución en la inducción homóloga de receptores a FSH por el GnRH (176), por un mecanismo no dilucidado todavía, que a un efecto directo del receptor de GnRH. Más aún, la asincronía entre la prevención de los efectos del AMPc (que empieza a ser evidente a las 3 horas de la adición de GnRH), y la disminución en la acumulación del nucleótido y de la actividad de la adenilil ciclasa, hablaría a favor de la existencia de un lugar primario de acción localizado después de la producción de AMPc, y otro secundario a nivel del receptor de FSH (177). En cuanto a la identidad de la(s) etapa(s) distal(es) a la generación de AMPc sobre las que el GnRH actuaría primariamente, existen varias posibilidades. El GnRH previene los efectos inhibitorios de la FSH sobre la fosfodiesterasa que metaboliza AMPc, impidiendo así la acumulación del nucleótido propiciada por la FSH (143,144). Sin embargo, éste no puede ser tampoco el mecanismo básico de acción del GnRH, puesto que los análogos no metabolizables del AMPc y el inhibidor de la fosfodiesterasa, metil-isobutil xantina (MIX), no son capaces de prevenir la depresión que el GnRH produce en los efectos diferenciadores de la FSH y su mensajero (140). El GnRH disminuye el número de lugares de unión de AMPc a la subunidad regulatoria de la proteína quinasa AMPc-dependiente tipo II, y retrasa la ac-

tivación de tal proteína quinasa, producida muy tempranamente por FSH, durante al menos 60 minutos (178). La FSH induce a largo plazo la síntesis de proteína quinasa AMPc-dependiente tipo II, y este aumento de la síntesis puede ser prevenido con GnRH (178). Esta constituiría una segunda alternativa a la localización del lugar post AMPc de inhibición del GnRH, que en modo alguno agota, sin embargo, las posibilidades.

Sea cual sea la identidad de la etapa del sistema de señalización de la FSH que el GnRH interfiere prioritariamente, persiste aún el interrogante acerca de cómo se realiza tal interferencia o, expresado de otra forma, cuál es el mensajero intracelular del GnRH en célula granulosa ovárica.

El GnRH aumenta el marcaje de PI y ácido fosfatídico en célula granulosa ovárica (158) y el recambio de fosfolípidos del inositol (179,180). Ambos efectos sugieren la existencia de una hidrólisis de fosfoinositósidos acoplada al receptor de GnRH, que efectivamente tiene lugar de forma rápida tras la ocupación del receptor, con acumulación de  $IP_3$  y DAG en el citoplasma de la célula granulosa (158,181). La aplicación a la célula granulosa de ésteres de forbol, cuyo receptor intracelular es la proteína quinasa C, o de análogos del DAG, en presencia de FSH, reproduce todos los efectos biológicos del GnRH (182-184). Así pues, parece probable que el DAG sea el segundo mensajero del GnRH en célula granulosa ovárica, y los efectos de éste descritos hasta el presente sobre el sistema de señalización de la FSH, y en consecuencia sobre los efectos biológicos de la hormona, dependan de la activación/inactivación de proteínas por fosforilación con proteína quinasa C.

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF) Y TGF $\alpha$ 

Las acciones estimuladoras del EGF no están relacionadas con lugares próximos a la producción de AMPc ya que el EGF disminuye la actividad adenilil ciclasa y aumenta la fosfodiesterasa, y, por lo tanto, produce una disminución de la [AMPc] intracelular (13). Además, su efecto sobre la inducción de receptores a LH y sobre la producción de estrógenos estimulada por FSH ocurre distal a la formación de AMPc; ya que suprime también la síntesis de estrógenos inducida por Ctx, (Bu<sub>2</sub>)AMPc y PGE<sub>2</sub> (126). De forma similar deprime la actividad aromatasa en células granulosa no estimuladas por otros agonistas.

Por otra parte, es conocido que estimula la síntesis de tPA, por un mecanismo independiente de la PKC en el que se precisa de la síntesis proteica (la inducción del ARNm del tPA producida por el EGF es inhibida por la cicloheximida) (128).

Y por último, recordar que su receptor está relacionado estructuralmente con el de la insulina, si bien no existe competencia entre ambas hormonas por sus receptores específicos. La unión del EGF estimula la actividad tirosina quinasa del receptor, esencial para obtener la respuesta celular, y que conduce a un aumento de la fosforilación de sus sustratos intracelulares (185).

El EGF produce la fosforilación de la PLC inositol-específica (186), promoviendo el turnover de PI y generando DAG que activa una PKC que a su vez fosforila el receptor regulando su afinidad por el agonista, su actividad tirosina quinasa y su localización intracelular.

#### IV.- LOS FOSFATIDILINOSITOL GLICANOS EN LA TRANSMISION DE LA SEÑAL HORMONAL

Recientemente se ha demostrado la existencia en las membranas de hepatocito (169,172,187-190), hepatoma (171,172), adipocito (191), células CHO (192), miocito (170), linfocito (193), glomerulosa (194), de una familia de glicofosfolípidos, que se ha relacionado con las señales bioquímicas involucradas en el mecanismo de acción de la insulina y cuya estructura básica guarda semejanzas estructurales con el Fosfatidilinositol glicano (PI-glicano o PI-G) de anclaje a membrana de determinadas proteínas existentes en bacterias y células eucariotas (195,196). Estas semejanzas incluyen que: i) son hidrolizados por la fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PLC-PI) de Staphilococcus aureus, Bacillus cereus o Bacillus thuringiensis (171,172,192, 193). ii) El glicofosfolípido purificado puede ser roto por deaminación con ácido nitroso dando lugar a PI, lo que señala la presencia de inositol fosfato unido a glucosamina no acetilada (171,172). iii) La porción diacilglicerol del fosfolípido contiene ácidos grasos saturados (palmítico y mirístico) (170,- 171,193).

La cabeza polar del PI-glicano está fosforilada (172,193,197) y contiene otros azúcares además del inositol (169,170) y la glucosamina (170,171,193) cuya naturaleza, número, localización y configuración dentro de la molécula varía dependiendo del tejido del cual ha sido aislada. De forma similar, tampoco es constante, para células distintas, la composición en ácidos grasos (170,171,190,193) del PI-G.

El fosfatidilinositol glicano aislado de hígado y hepatoma H35 por Mato y cols., es sensible al tratamiento con  $\beta$  galactosidasa (191), lo cual indica la presencia de residuos galactosa con enlaces  $\beta$  glicosídicos en la molécula. Se han identificado alrededor de cuatro de estos residuos por cada molécula de inositol (172), y uno de ellos constituye probablemente la porción terminal y está fosforilado.

Larner y cols. han aislado, de hígado de rata, un PI-glicano que posee una composición de carbohidratos similar a la de los PI-glicanos de anclaje de proteínas, con inositol, galactosamina y manosa, y cuya cabeza polar podría también mediar algunas de las acciones de la insulina (190). La sensibilidad del PI-G a la PLC-PI sugiere la presencia de PI en la molécula (171,172); sin embargo, las variaciones estructurales existentes entre los PI-glicanos de diferentes tejidos afectan a la sensibilidad de la molécula a la PLC-PI (171, 192,193). El PI-glicano aislado de Rat-1 es resistente a la hidrólisis con PLC específica para PI, y al tratamiento con ácido nítrico (Alemany, Clemente y Mato, no publicado).

En la gran mayoría de los glicofosfolípidos, la mitad polar de la molécula se encuentra localizada hacia el compartimiento citoplasmático. En el caso del PI-G que nos ocupa, marcajes específicos realizados con moléculas que no pueden atravesar la membrana plasmática (187), demuestran que, al igual que en los PI-G que forman anclaje de algunas proteínas a las membranas (196), la cadena de oligosacáridos que forman la mitad polar, se encuentra localizada preferentemente en la superficie externa de la membrana (187,191,198).

La insulina activaría una fosfolipasa C específica (170,199,200) que hidroliza al fosfatidilinositol glicano produciendo diacilglicerol (DAG) y la cabeza polar, el fosfoligosacárido (POS).

Puesto que el DAG generado por la hidrólisis del PI-G no es capaz de activar proteína quinasa C (199,201), y sólo parece responsable de un cierto aumento en el transporte de glucosa cuando es aplicado a adipocitos (201), se ha concluido que la cadena de oligosacáridos debe ser la activa en términos de transmitir la señal, en el caso de que los PI-G sean hidrolizados en respuesta a la interacción entre un agonista hormonal y su receptor de membrana. La hidrólisis se produce muy rápidamente (entre 15" y 2') y ha sido descrita en respuesta a la insulina, en hepatocitos (172,187), hepatoma H35 (171,172), adipocitos (191), linfocito T (193) y miocitos BC<sub>3</sub>H1 (170); a IGF-I en células CHO (192) y miocitos BC<sub>3</sub>H1 (203) y a EGF en miocitos BC<sub>3</sub>H1 (203). Asimismo la ACTH y el NGF son capaces de hidrolizar un PI-G en células glomerulosa (194) y PC-12 (204) respectivamente.

Es especialmente importante, la observación realizada en hepatocito, linfocitos T (193) y células CHO (192) de la existencia de una relación entre el número de receptores de insulina, y su actividad tirosina quinasa, y los niveles de PI-G.

Una parecida dependencia puede observarse para el receptor de IGF-I y la proporción de PI-G existente en la membrana de las células CHO transfectadas con el receptor para el factor de crecimiento (192).

La cabeza polar del fosfoinositol glicano modula la actividad de ciertos enzimas cuando es añadida a extractos celulares o a los enzimas purificados: la fosfodiesterasa de AMPc (170,205), la adenilil ciclase (205), la proteína quinasa A (193,206), la piruvato deshidrogenasa (190,205,208), la fosfolípido metiltransferasa (207) y la cascina quinasa II.

Al contrario que otros mensajeros intracelulares que son generados en la superficie interna de la membrana, la localización de los PI-glicanos en la cara externa, conduce a una liberación de la cabeza polar (POS) en el espacio extracelular (187,198) tras su producción durante la hidrólisis acoplada a los receptores para las hormonas que se han enumerado. Además, cuando el POS es añadido a adipocitos o hepatocitos intactos, mimetiza algunas de las acciones de la insulina.

Recientemente se han obtenido algunas evidencias de la existencia en la membrana del hepatocito, de un sistema de transporte del POS, que alcanza una velocidad máxima de transporte a 37<sup>o</sup> C, y es regulado por la propia insulina, en un proceso dosis y tiempo dependiente (209).

El POS así transportado mimetiza en el hepatocito, los efectos reguladores de la insulina sobre la glicógeno fosforilasa (210), la piruvato quinasa (210), fosfolípido metiltransferasa (188), adenilil ciclase (205,210).

El transporte de POS no ha sido demostrado en adipocito. A pesar de ello, y puesto que la membrana de esta célula permite su paso, ha sido posible medir los efectos del POS sobre la lipólisis (189), lipogénesis (202), metabolismo de la glucosa (202) y actividad de los enzimas fosfolípido metiltransferasa

(188,207) y piruvato deshidrogenasa (208). Los resultados han mostrado que el POS reproduce en este tejido casi todos los efectos atribuibles a la insulina, aunque no el transporte de glucosa (189,202).

La cabeza polar del PI-glicano estimula las mismas vías de señalización que la insulina, el POS tiene efectos insulin-like en la fosforilación/ defosforilación de los enzimas fosfolípido metiltransferasa (207), ATP citrato liasa, lipasa hormono sensible, glicógeno fosforilasa, una fosfoproteína 65 kD y una 50 kD , y la proteína ribosomal S6 (211). Puesto que mimetiza efectos tanto dependientes, como independientes del AMPc, se sugiere que la producción hidrolítica del POS es un paso inicial en el mecanismo de señalización de la insulina.

En conjunto, ésto viene a suponer un nuevo modelo de transmisión de la señal hormonal en el que la insulina, y tal vez otras hormonas, promueve la hidrólisis de un PI-G en la superficie externa de la célula con liberación de su cabeza polar y diacilglicerol. El POS, que forma la cabeza polar, entra en la célula y modula el estado de fosforilación de proteínas clave.

## 2. OBJETIVOS

Los OBJETIVOS del presente trabajo han sido:

- 1) Demostrar si existe, en la célula granulosa, un fosfatidilinositol glicano como los descritos en otras células.
- 2) Establecer, en lo posible, su estructura y semejanzas con los ya descritos.
- 3) Investigar la posibilidad de que dicho fosfatidilinositol glicano sea utilizado por alguno de los agonistas de la célula granulosa como mensajero intracelular.

Para ello hemos utilizado cultivos primarios de células granulosa obtenidas por punción de los folículos preantrales de ratas inmaduras tratadas con estrógenos; estas células fueron mantenidas en medios libres de suero adicionándoseles varias hormonas. Este modelo proporciona varias ventajas:

- 1) Las células granulosa de ratas inmaduras han estado mínimamente expuestas a gonadotropinas endógenas y, por tanto, permanecen en un estado relativamente indiferenciado.
- 2) El tratamiento "in vivo" con estrógenos inhibe la secreción hipofisaria, produce la formación de múltiples folículos preantrales y proporciona un número elevado de células relativamente homogéneas, en idéntico estado de desarrollo.
- 3) No se necesita colagenasa u otras enzimas proteolíticas para el aislamiento celular, evitándose así, cambios en la capacidad de respuesta a las hormonas.
- 4) Al usar medios libres de suero se puede estudiar el efecto de las hormonas circulantes y de varios factores séricos independientemente, sin interferencias de los restantes.

- 
- 5) Los cultivos primarios de células granulosa, a diferencia de las líneas celulares ováricas, conservan la respuesta a las hormonas y las funciones fisiológicas semejantes a las existentes "in vivo".

### 3. MATERIAL Y METODOS

1. MATERIALES UTILIZADOS	50
1A.- Hormonas y reactivos específicos	
1B.- Isótopos	
1C.- Esteroides	
1D.- Material de cultivo	
1E.- Material cromatográfico	
1F.- Reactivos generales	
1G.- Animales	
2. OBTENCION Y CULTIVO DE CELULAS GRANULOSA	53
2A.- Tratamiento de animales y extracción de órganos	
2B.- Obtención y cultivo de células granulosa	
3. MARCAJE, EXTRACCION, SEPARACION Y CARACTERIZACION DEL FOSFATIDILINOSITOL GLICANO	55
3A.- Marcaje de células granulosa	
3B.- Extracción del Fosfatidilinositol glicano	
3C.- Separación del Fosfatidilinositol glicano	
3D.- Purificación del Fosfatidilinositol glicano	
3E.- Tratamiento con ácido nitroso	
3F.- Tratamiento con Fosfolipasa C	
3G.- Hidrólisis ácida	
3H.- Tratamiento con Fosfolipasa A <sub>2</sub>	
4. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS	60
5. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA 3β-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA Δ <sup>4</sup> -Δ <sup>5</sup> ISOMERASA	60
5A.- Obtención de los extractos celulares	
5B.- Reacción enzimática	
5C.- Extracción y separación de los productos de la reacción	
5D.- Cálculo de la actividad del enzima	
6. TRATAMIENTO ESTADISTICO	62

## 1. MATERIALES UTILIZADOS

### 1A.- Hormonas y reactivos específicos

La Folitropina ovina (hormona folículo estimulante), oFSH [NIADDK-oFSH-16, potencia 20 U/mg; actividad LH 0.04x NIH-LH- S1 por mg; actividad de PRL <0.1% en peso], la Prolactina [NIADDK-rPRL-B-5, potencia 25 U/mg] y la hCG (hormona gonadotropina coriónica humana-121, 13450 U/mg) fueron donadas por el National Hormone and Pituitary Program (NIH) y diluídas con medio McCoy's 5a modificado inmediatamente antes de usar. El [Gly-OH<sup>10</sup>]LHRH (hormona liberadora de gonadotropinas) o GnRH, se obtuvo de Sigma al igual que la insulina (24.5 I.U/mg) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF); el factor de crecimiento similar a la insulina-1, somatomedina C/IGF-I (14000 U/mg) y la Fosfolipasa A<sub>2</sub> procedían de Boehringer Mannheim. La Fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol, obtenida a partir de Staphylococcus aureus, al igual que la cabeza polar del fosfatidilinositol glicano (POS) fue una generosa donación del Dr. D. J.M. Mato, (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Fundación Jiménez Díaz).

El DibutirilAMPc (db AMPc o N'-2'-O-dibutiriladenosin-3'-5'-monofosfato cíclico) y la toxina del Vibrio cholerae (coleratoxina o Ctx) se adquirieron a Sigma.

### 1B.- Isótopos

Todos los isótopos utilizados se adquirieron a New England Nuclear: [6-<sup>3</sup>H]Hidrocloruro de glucosamina (30.0 Ci/mmol), D[6-<sup>3</sup>H]Galactosa (40.0

Ci/mol), D[2-<sup>3</sup>H]Manosa (30.0 Ci/mmol), [2-<sup>3</sup>H]Mioinositol (14.6 Ci/mmol); Fosfatidilinositol-4-fosfato [2-<sup>3</sup>H]inositol (<sup>3</sup>H-DPI) (4.5 Ci/mmol); Fosfatidilinositol-4-5-bifosfato, [2-<sup>3</sup>H]inositol (<sup>3</sup>H-TPI) (4.4 Ci/mmol); [9,10-<sup>3</sup>H]Acido palmítico (10-30 Ci/mmol) y [9,10-<sup>3</sup>H] Acido mirístico (39.3 Ci/mmol).

Los esteroides radioactivos: [7-<sup>3</sup>H]Pregnenolona (22.6 Ci/ mmol, [4-<sup>14</sup>C]-Progesterona (52.2 mCi/mmol), se purificaron antes de usar por cromatografía en capa fina (CCF) desarrollada dos veces en el sistema cloroformo/éter (5:1) tal y como se especificará más adelante.

### 1C.- Esteroides

Las hormonas esteroideas: Pregnenolona ( $\Delta^5$ -Pregnen-3 $\beta$ -ol-20-ona), Progesterona ( $\Delta^4$ -Pregnan-3, 20-diona) y 20 $\alpha$ -OH Pro (20 $\alpha$ -hidroxi- $\Delta^4$ -pregnen-3-ona) se obtuvieron de Sigma, y se purificaron antes de usar por recristalización a partir de una solución en etanol absoluto, caliente y saturada. También Sigma proporcionó el estrógeno de síntesis dietilestilbestrol (DES).

### 1D.- Material de cultivo

Todos los medios de cultivo y productos con los que éstos fueron suplementados se obtuvieron de Gibco, a excepción de los antibióticos, que fueron adquiridos a Sigma.

Los cultivos se realizaron en placas (35x10 mm) o en tubos (12x75 mm) Falcon estériles (Becton Dickinson Labware). Los filtros Millex GV (0.22  $\mu$ m) se obtuvieron de Millipore.

### 1E.- Material cromatográfico

Los lípidos estándar (ácido fosfatídico, PA; fosfatidilcolina, PC; fosfatidilinositol, PI; fosfatidilinositol, 4-fosfato, DPI; fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, IPI) se obtuvieron de Sigma.

Las placas para cromatografía en capa fina de silicagel 60, unas con soporte de plástico (20x20 cm y 0.2 mm de espesor) y las otras con soporte de cristal (20x20 cm espesor de capa 0.25 mm), fueron de Merck.

Los solventes utilizados: cloroformo, metanol, ácido acético glacial, acetona, éter etílico, hexano, hidróxido amónico, piridina y acetato de etilo fueron BDH, calidad Analar.

### 1F.- Reactivos generales

El resto de los productos utilizados en la presente tesis doctoral fueron de la mejor calidad analítica posible.

### 1G.- Animales

Se utilizaron ratas hembra inmaduras de la cepa Sprague Dawley, criadas en el bioterio del Colegio Universitario de Las Palmas, y mantenidas en jaulas transparentes en condiciones de estabulación óptimas. Los animales estuvieron sometidos a temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e iluminación (ciclo de 12 horas de luz, 12 de oscuridad, comenzando la luz a las 06.00) controladas y constantes. Tenían libre acceso al agua y su dieta fue la estándar de laboratorio (Biona, Las Palmas) "ad libitum".

## 2. OBTENCION Y CULTIVO DE CELULAS GRANULOSA

Un esquema simplificado del proceso de obtención y cultivo de células granulosa, se muestra en la Fig. 1 (42, 212).

### 2A.- Tratamiento de animales y extracción de órganos

a.- Cuando aún eran inmaduras sexualmente (entre los 23 y 25 días de edad) se iniciaba el tratamiento con DES en solución oleosa a razón de 1 mg/60  $\mu$ l de solución/rata/día, por vía subcutánea, tratamiento que se mantuvo durante 5 días y mediante el cual se estimulaba la aparición de folículos preantrales en igual estadio de desarrollo y la proliferación de una población homogénea de células granulosa.

b.- Tras el tratamiento con DES, los animales (10 a 30 por experimento) se sacrificaron por dislocación cervical y se realizó la extracción de los ovarios en condiciones de máxima esterilidad. Brevemente, el proceso consistía en:

- a) Sacrificio de las ratas en el cuarto de cirugía.
- b) Irrigación de la región dorsal de la rata con etanol al 70%, para esterilizar el campo quirúrgico.
- c) Extracción de los ovarios por vía retroperitoneal. Conservación de los órganos en tubos Falcon estériles de 50 ml que contenían medio McCoy's 5a modificado a 4°C.

Durante todo el proceso de sacrificio y ovariectomía no se emplearon más de 2-3 min/rata.

•CULTIVO DE CELULAS GRANULOSA •

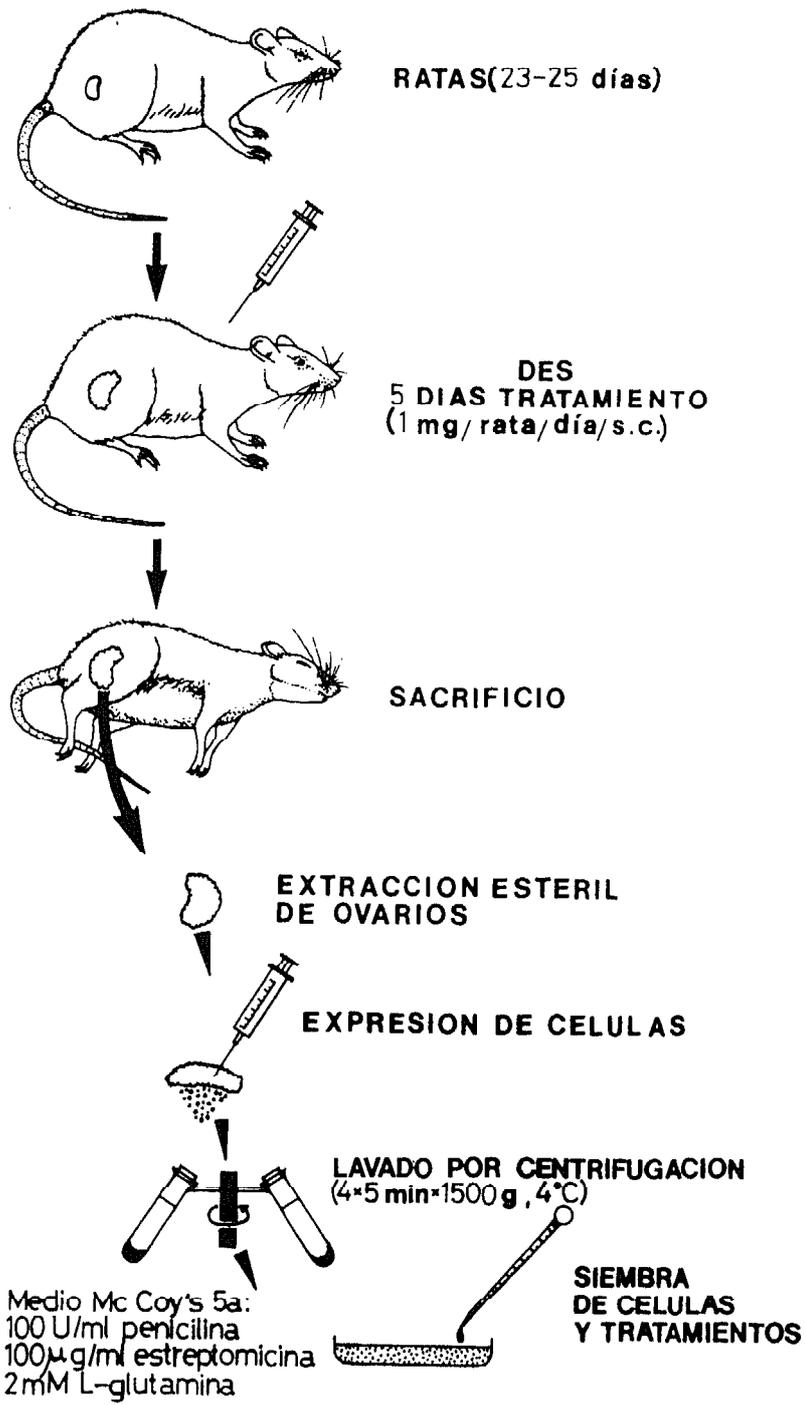


Fig 1

## 2B. Obtención y cultivo de células granulosa

- a.-Los ovarios extraídos en el cuarto de cirugía eran trasladados al cuarto de cultivos donde, en una campana de flujo de aire laminar, eran lavados mediante pases sucesivos por 4-5 placas de cultivo estériles que contenían el mismo medio McCoy's 5a.
- b.-Utilizando una lupa binocular se separó el parénquima ovárico de la cubierta grasa periovárica y de los restos de trompa unidos al hilio. Tras someterlos a un nuevo proceso de lavado quedaron en disposición de ser utilizados para la obtención de las células granulosa.
- c.-Se colocaron a razón de 2-3 ovarios, en placa de cultivo estéril y con medio McCoy's 5a modificado frío, bajo la lupa binocular y de ellos, se extrajeron las células granulosa mediante punción cuidadosa de los folículos preantrales usando agujas estériles de 27x1/2". Las células granulosa fluían con el líquido folicular al medio de cultivo.
- d.-Los medios correspondientes a la punción de los ovarios se recolectaron en tubos estériles de 50 ml, mantenidos en frío. El resto del tejido ovárico se desechó.
- e.-Se realizó el lavado de las células mediante centrifugación en centrífuga refrigerada Beckman GPR de baja velocidad (4 °C, 1500 g x5 min), desechándose los sobrenadantes y añadiéndose 20 ml de medio fresco; el pellet celular se dissociaba por aspiración repetida del medio con pipetas plásticas estériles de calibres decrecientes y agitación en agitador Reax 2000 de Heildolph. Tras la tercera centrifugación el pellet se resuspendió en 2.5-5 ml de medio para realizar la evaluación del número de células existente y su viabilidad.

f.-El número de células existentes y su viabilidad se determinó tomando 25  $\mu$ l de la suspensión celular a los que se añadieron 25  $\mu$ l de azul de tripán. Tras agitación se contaron las células existentes en 25  $\mu$ l de esta mezcla colocados en una cámara de Neubauer. En todos los experimentos la viabilidad celular obtenida, medida en términos de la capacidad para excluir el azul de tripán, fue mayor o igual al 60% (Fig 4 B).

g.-Las células granulosa fueron cultivadas en placas de cultivo Falcon de 35x10 mm,  $10^6$  células viables/placa en 1 ml de McCoy's o Ham F-10 sin suero y adicionando, momentos antes de iniciarse el cultivo, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycinina y L-glutamina 2mM. El tiempo y las condiciones de cultivo fueron variables dependiendo de los parámetros a estudiar. A lo largo de todos los experimentos realizados, las células se mantuvieron en un incubador Heraeus a 37<sup>o</sup> C, en una atmósfera saturada de agua y con una presión constante de CO<sub>2</sub> del 5%.

### 3. MARCAJE, EXTRACCION, SEPARACION Y CARACTERIZACION DEL FOSFATIDIL-INOSITOL GLICANO (171,172)

#### 3A.- Marcaje de células granulosa

Las células granulosa fueron cultivadas en medio McCoy's 5a modificado o Ham F-10 a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en placas de cultivo Falcon. Las células ( $10^6$ /placa) fueron marcadas durante tiempos variables (8, 12, 24, 48, 72 horas) en presencia de 5  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]palmítico, [<sup>3</sup>H]inositol o [<sup>3</sup>H]mirístico, o 25  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]glucosamina, [<sup>3</sup>H]galactosa o [<sup>3</sup>H]manosa.

### 3B.- Extracción del fosfatidilinositol glicano

Al finalizar el período de incubación, se aspiró y desechó el medio, y se añadieron 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío al 5% a cada placa. Durante 15 minutos se mantuvieron las placas a 4 °C; posteriormente las células de cada placa por separado fueron raspadas y transferidas a un tubo de cristal limpio (18x120 mm). Las placas se lavaron una vez con 1 ml de TCA al 5% y se añadieron estos lavados al tubo correspondiente tras lo cual:

- a.- los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga Beckman GPR de baja velocidad
- b.- el sobrenadante se descartó y el pellet fue extraído con cloroformo/ metanol (1:2) conteniendo HCl 0.05 N
- c.- después de permanecer 30 min a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó (2000 rpm, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio
- d.- el pellet se extrajo de nuevo con 1.5 ml de la misma mezcla de cloroformo/ metanol/HCl; se centrifugó y el sobrenadante se unió al anterior mientras el pellet se descartó
- e.- a los sobrenadantes almacenados se les añadió 1.5 ml de cloroformo y 1.5 ml de KCl 0.1 M; se agitó la mezcla y posteriormente se separaron las fases orgánica y acuosa mediante centrifugación a 4 °C
- f.- la fase acuosa se descartó, y la orgánica fue tratada con 1.5 ml de KCl 0.1 M en metanol al 50%; tras agitación, se almacenaron las muestras a -20 °C durante 30 min con lo que se producía la separación de las fases orgánica y acuosa.
- g.- la fase acuosa era desechada y la orgánica evaporada a sequedad en un baño a 40-50 °C bajo una fuente de nitrógeno.

### 3C.- Separación del Fosfatidilinositol glicano

Las muestras secas se disolvieron en 50  $\mu$ l de cloroformo/ metanol (2:1) y aplicaron a un placa de cromatografía en capa fina (CCF) de silicagel con soporte de cristal.

Las placas de CCF se desarrollaron por dos veces en cloroformo/acetona/ metanol/ácido acético glacial/agua (50:20:10:10:5) tras lo cual se rasparon regiones de un cm de alto y se contó la radioactividad que tenían asociada, usando 3 ml de líquido de centelleo (Optiscint "HiSafe" de LKB Wallac), en un contador de centelleo líquido LKB/1211 Rackbeta.

### 3D.- Purificación del Fosfatidilinositol glicano

Para purificar el fosfatidilinositol glicano, los lípidos marcados se cromatografiaron tal como se describe en el apartado anterior. La sílice obtenida del rascado de los dos o tres primeros centímetros se eluyó por dos veces con 2 ml de metanol a 37°C. El metanol de los lavados fue almacenado, llevado a sequedad bajo una fuente de nitrógeno a 40-50°C y luego aplicado a una CCF que se desarrolló en cloroformo/metanol/NH<sub>4</sub>OH/agua (45:45:3.5:1.5). Se rasparon regiones de un cm y se determinó la radioactividad que tenían asociada en las mismas condiciones que las ya descritas.

Los Rf del PI-glicano y los distintos fosfolípidos tras la separación y purificación se representan en la Figura 2.

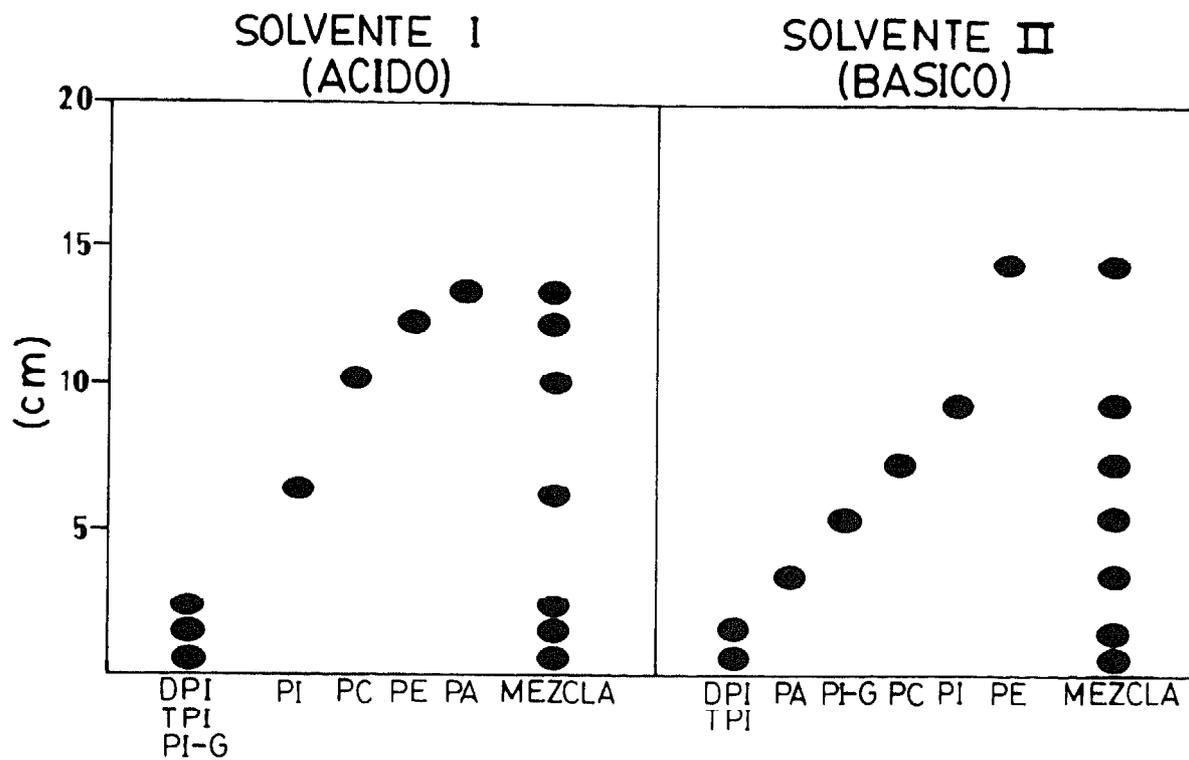


Fig 2

### 3E.- Tratamiento con ácido nitroso

Una muestra del fosfatidilinositol glicano purificado marcado con [ $^3\text{H}$ ]-glucosamina fue secado bajo una fuente de nitrógeno y resuspendido en 100  $\mu\text{l}$  de acetato sódico 50 mM, pH 3.5. Después de añadirle 100  $\mu\text{l}$  de nitrito sódico ( $\text{NaNO}_2$ ) 0.33 M recién preparado se incubó durante 12 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación se neutralizó con una gota de bicarbonato amónico ( $\text{NH}_4\text{CO}_3$ ) 1 M y se liofilizó. El extracto seco se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de cloroformo/metanol (2:1) y se aplicó a una placa de CCF que se desarrolló en cloroformo/metanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$ /agua (45:45:3.5:1.5). Después se rasparon regiones de 1 cm de alto y la radioactividad asociada con cada una de ellas se determinó por conteo con líquido de centelleo.

### 3F.- Tratamiento con Fosfolipasa C

Una muestra del fosfatidilinositol glicano purificado marcado con [ $^3\text{H}$ ]-glucosamina o con [ $^3\text{H}$ ]palmítico fue secado bajo una fuente de nitrógeno y resuspendido en 200  $\mu\text{l}$  de tampón borato 20 mM, pH 7.5; se sonicó durante 5 minutos 3 veces y se le añadió 1 U de fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol (PLC-PI) de S. aureus incubándose durante toda la noche a 37 $^{\circ}$  C. La reacción se paró con 750  $\mu\text{l}$  de cloroformo/metanol/HCl (2:1:0.03 N). Se microfugó a 8000 g durante 1 min, se agitó y repitió el proceso 2 veces más. Se tomó la fase superior y se lavó la inferior con 0.5 ml de NaCl 0.005 M en 50% metanol. Se reunieron las fases acuosas y se liofilizaron, mientras que la fase orgánica se secó.

Cada fase fue redisuelta en 250  $\mu\text{l}$  contándose una alícuota de cada una. El resto se aplicó a una placa de CCF que se desarrolló en cloroformo/metanol/

NH<sub>4</sub>OH/agua (45:45:3.5:1.5), midiéndose a continuación la radioactividad presente en la placa que se raspó en zonas de 1 cm de alto.

### 3G.- Hidrólisis ácida

Una muestra del fosfatidilinositol glicano purificado y marcado se evaporó a sequedad y resuspendió en 200-400  $\mu$ l de HCl 4 N tras lo cual se incubó durante 24 horas a 110 °C. Al final de este período se le añadió 1 ml de agua y se liofilizó. El extracto liofilizado se redisolvió en un pequeño volumen de agua que se aplicó a una placa de CCF y se desarrolló en piridina/acetato de etilo/ácido acético glacial/agua (5:5:1:3). Después se rasparon regiones de 1 cm de alto y se determinó la radioactividad asociada a cada fracción.

### 3H.- Tratamiento con Fosfolipasa A<sub>2</sub>

Una muestra de PI-glicano marcado con [<sup>3</sup>H]palmitato o [<sup>3</sup>H]miristato se resuspendió en 0.2 ml de polietilenglicol 0.1% en 125 mM Tris HCl, pH 9.5, y se incubó en presencia de 2400 U/ml de fosfolipasa A<sub>2</sub> durante 30 minutos a 37 °C, tras lo cual se secó en Speed-Vac. La muestra seca se redisolvió con 50  $\mu$ l de metanol, se aplicó a una placa de CCF que se desarrolló en cloroformo/metanol/NH<sub>4</sub>OH/agua (45:45:3.5:1.5) y se rascaron regiones de 1 cm de alto. La radioactividad que tenía asociada cada fracción, se determinó por contaje con líquido de centelleo.

#### 4. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

Las proteínas se midieron por espectrofotometría por el método del azul brillante de Coomasie (213) tal y como lo suministra Bio-Rad utilizando un espectrofotómetro Gilford STASAR III a longitud de onda de 595 nm. El estándar empleado fue albúmina bovina de Sigma, diluída seriadamente partiendo de una solución estándar patrón de 250  $\mu\text{g}/800 \mu\text{l}$ .

Los datos de absorbancia se ajustaron por el método de los mínimos cuadrados mediante una calculadora de mesa Casio fx50F.

#### 5. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA $3\beta$ -HIDROXIESTEROIDE-DESHIDROGENASA $\Delta^4$ - $\Delta^5$ ISOMERASA ( $3\beta$ -HSD) (E.C. 1.1.1.51)

La actividad del enzima  $3\beta$ -HSD se midió por un método radioenzimático basado en la transformación de pregnenolona en progesterona. Se utilizó pregnenolona tritiada que se convierte en progesterona tritiada por homogeneizados de células en presencia de  $\text{NAD}^+$  (214,215).

##### 5A.- Obtención de los extractos celulares

Al finalizar el tiempo de cultivo las placas se colocaron en frío, el medio se aspiró y desechó; las células se lavaron con tampón fosfato frío (fosfato 0.05 M, EDTA 1 mM, pH 7.4) y se rascaron con una espátula de American Scientific products transfiriéndose a un tubo de cristal. Se sonicaron las células en frío con un sonicador Labsonic 2000 (70 watos, 10 seg).

### 5B.- Reacción enzimática

La actividad enzimática se determinó tomando 10-100  $\mu\text{g}$  de proteínas celulares en 80  $\mu\text{l}$  de homogeneizado que se añadieron a 20  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 0.05 M, EDTA 1 mM, 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{NAD}^+$ , 50  $\mu\text{M}$  pregnenolona ( $\approx 2 \times 10^5$  cpm), 3% de dimetilsulfóxido, pH 7.4. La reacción transcurre con los tubos mantenidos en baño de agitación Dubnoff a 37<sup>o</sup> C y agitación de 100 ciclos/min durante 30 min, al finalizar los cuales se paró la reacción con 10 volúmenes de éter dietílico frío. A continuación, se añadía a cada tubo [<sup>14</sup>C]Progesterona ( $\approx 600$  cpm), para determinar la eficacia de la extracción, 5  $\mu\text{g}$  de Progesterona, 5  $\mu\text{g}$  de 20 $\alpha$ -OH Pro y 25  $\mu\text{g}$  de Pregnenolona para visualizar los esteroides después de su separación.

### 5C.- Extracción y separación de los productos de la reacción

La fase etérea se obtuvo por solvatación de la fase acuosa con 110 mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro o congelando la fase acuosa en un baño de acetona/hielo seco. La fase orgánica se transfirió a tubos de vidrio (12x75 mm) y se secó bajo una corriente de nitrógeno. El extracto orgánico seco se redisolvió en 50  $\mu\text{l}$  de cloroformo y los tipos de esteroides existentes se separaron mediante CCF desarrollada dos veces en el sistema cloroformo/éter (5:1). La Pregnenolona se visualizó con vapor de yodo y los progestágenos (Progesterona y 20 $\alpha$ -OH Pro) con luz ultravioleta (u.v.).

Los Rf para pregnenolona y progesterona fueron 0.59 y 0.80 respectivamente (Figura 3). Las manchas correspondientes a progesterona se recortaron y se contó la radioactividad que tenían asociada con 3 ml de líquido de centelleo.

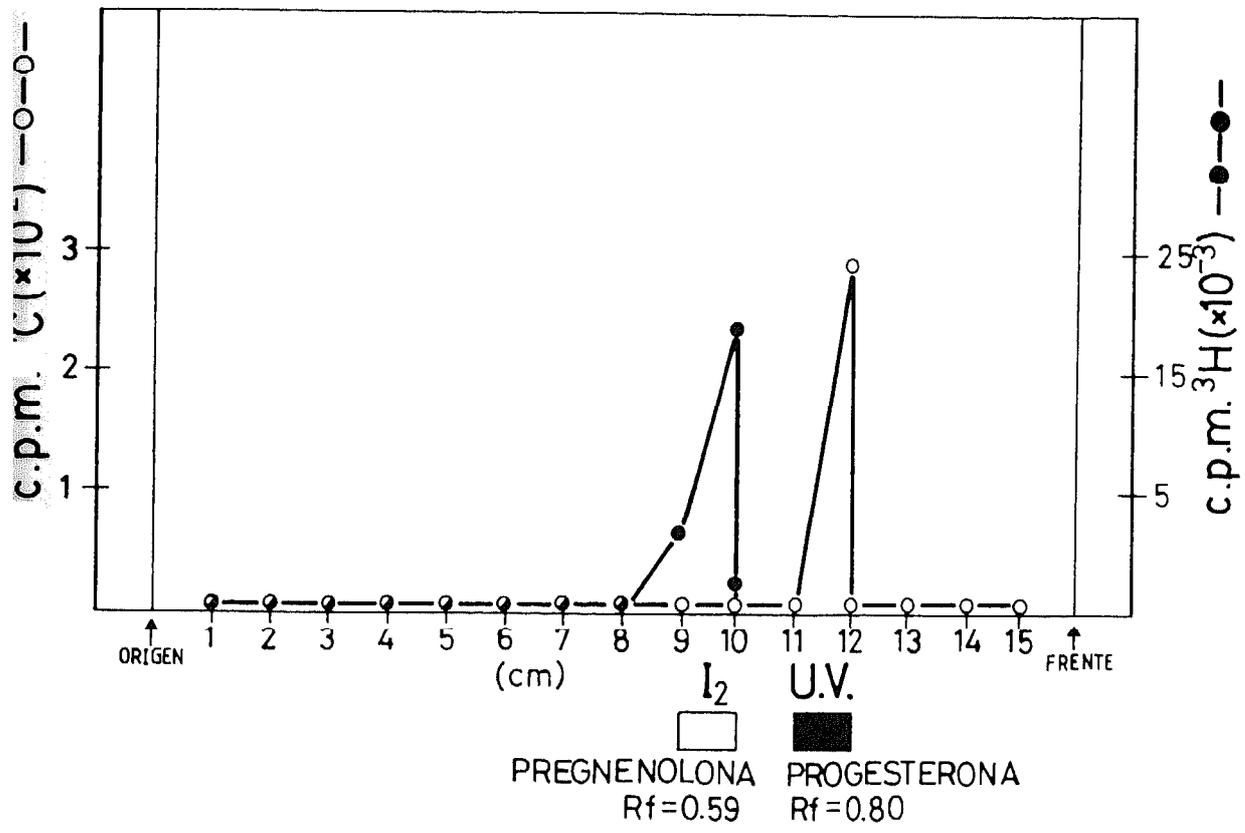


Fig 3

5D.- Cálculo de la actividad del enzima

La actividad se calculó según la ecuación:

actividad total= nmoles Progesterona formados/ 80  $\mu$ l/ 30 min

$$\frac{\text{nmoles (tubo)} \times {}^{14}\text{C}}{}$$

$${}^3\text{H} \times \text{R.C.}$$

Donde:  ${}^3\text{H}$ = cpm totales de pregnenolona tritiada añadidas a los tubos de ensayo ( $\approx$  150,000 cpm)

${}^{14}\text{C}$ = cpm totales de  ${}^{14}\text{C}$ -progesterona añadida a cada tubo de ensayo ( $\approx$ 600 cpm)

R.C.= relación entre los canales de  ${}^{14}\text{C}$  y  ${}^3\text{H}$ .

## 6. TRATAMIENTO ESTADISTICO

Cada experimento fue realizado por triplicado y repetido al menos tres veces, escogiéndose el más representativo.

En cada punto "a" consideramos la variable aleatoria " $x_a$ " que representa la característica en estudio, medida en cada caso. Estimamos el valor medio de  $x_a$  mediante la media de la muestra (n objetos de la población, normalmente n= 3 o 4) y el error cometido mediante el error estándar, definido como:

$$s = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad \text{siendo } S^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1} (x_i - \bar{x})^2$$

Se aplicó el análisis de la varianza de un solo factor, a un nivel de significación del 0.05. En caso de no aceptarse la hipótesis nula, se aplica el test LSD.

#### 4. R E S U L T A D O S

1. OBSERVACIONES MORFOLOGICAS	65
2. IDENTIFICACION DE LOS COMPONENTES DE LA CABEZA POLAR DEL FOSFATIDILINOSITOL GLICANO	65
A) Incorporación de [ <sup>3</sup> H]glucosamina	
B) Incorporación de [ <sup>3</sup> H]galactosa	
C) Incorporación de [ <sup>3</sup> H]mioinositol	
E) Incorporación de [ <sup>3</sup> H]manosa	
3. IDENTIFICACION PARCIAL DE LA ESTRUCTURA DE LA CABEZA POLAR DEL FOSFATIDILINOSITOL GLICANO	68
A) Hidrólisis ácida	
B) Tratamiento con ácido nitroso	
4. IDENTIFICACION PARCIAL DE LOS COMPONENTES Y ESTRUCTURA DEL ESQUELETO DEL FOSFATIDILINOSITOL GLICANO	69
A) Incorporación de [ <sup>3</sup> H]palmitato	
B) Incorporación de [ <sup>3</sup> H]miristato	
C) Tratamiento con PLA <sub>2</sub>	
D) Tratamiento con PLC	
5. EFECTO DE LAS DIFERENTES HORMONAS REGULADORAS DE LA DIFERENCIACION DE LA CELULA GRANULOSA, EN EL CONTENIDO Y RECAMBIO DEL FOSFATIDILINOSITOL GLICANO	71
A) Efecto de la FSH	
B) Efecto de la Insulina	
C) Efecto del IGF-I	
D) Efecto de la hCG	
E) Efecto del EGF	
D) Efecto del GnRH	
F) Efecto de la Prolactina	
6. EFECTO DEL FOSFOOLIGOSACARIDO SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA 3β-HIDROXIESTEROIDE-DESHIDROGENASA Δ <sup>4</sup> Δ <sup>5</sup> ISOMERASA	75

## 1.- OBSERVACIONES MORFOLOGICAS CON EL MICROSCOPIO DE CONTRAS- TE DE FASES

Las células recién obtenidas de los ovarios de ratas inmaduras tratadas con DES fueron principalmente células redondeadas dispersas y, ocasionalmente, en pequeños acúmulos celulares (Fig 4 A). El número de células en tales agregados no solía exceder de media docena. Cuando las células permanecían 48 h en cultivo con FSH, se formaban agregados mucho mayores (Fig 4 D y E), cada uno formado por varias docenas de células. Las células de los agregados adquirían una forma similar a células epiteliales y estaban estrechamente empaquetadas (Fig 4 D). A menudo agregados vecinos estaban interconectados (Fig 4 E) formando una estructura similar a una cadena. Después del cultivo sin añadir hormonas (C), las células estaban más aplanadas que las tratadas (E).

## 2.- IDENTIFICACION DE LOS COMPONENTES DE LA CABEZA POLAR DEL FOSFATIDILINOSITOL GLICANO

Para determinar los azúcares que forman parte de la mitad polar del glicofosfolípido, se estudió la incorporación al PI-G de diversos azúcares tritizados.

### a) Incorporación de [<sup>3</sup>H]glucosamina a la molécula de PI-glicano

En la Fig 5, se muestra la incorporación de [<sup>3</sup>H]glucosamina a las células granulosa mantenidas en cultivo primario, a las que, como se describe en Mate-

rial y Métodos, se fueron incorporando 25  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]glucosamina a distintos tiempos antes de la terminación del experimento con TCA 5%.

Extraído y purificado el PI-glicano por separación en CCF utilizando las condiciones de solventes, tal y como se han descrito, pudo observarse una incorporación significativa de [ $^3\text{H}$ ]glucosamina al PI-glicano a las 24 horas de su adición al cultivo.

Ante la imposibilidad de lograr un marcaje a actividad específica constante durante las 72 horas que se mantiene un cultivo habitualmente, se lavaron los cultivos y se adicionó medio fresco conteniendo la misma cantidad de [ $^3\text{H}$ ]glucosamina que durante los 3 primeros días. En estas condiciones experimentales, se obtuvo una incorporación máxima constante a partir del 5<sup>o</sup> día de cultivo.

#### b) Incorporación de [ $^3\text{H}$ ]galactosa a la molécula de PI-glicano

Las c.p.m. de [ $^3\text{H}$ ]galactosa incorporadas al PI-glicano de las membranas de célula, se representan en la Fig 6.

Las células granulosa ( $10^6$ /placa) se cultivaron en presencia de 25  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]galactosa durante 48, 24, 8 ó 4 horas. El PI-glicano se extrajo tal y como se describe en Material y Métodos y se separó y purificó en una placa de silicagel desarrollada secuencialmente en cloroformo/acetona/metanol/ácido acético glacial/agua y cloroformo/metanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$ /agua.

Tras 24 horas de incubación con el isótopo, se obtuvo la máxima incorporación, que se mantuvo constante hasta las 48 horas.

c) Incorporación de [<sup>3</sup>H]mioinositol a la molécula de PI-glicano

En la Fig 7, se representan los resultados obtenidos tras incubar  $10^6$  células granulosa/placa con [<sup>3</sup>H]mioinositol (5  $\mu$ Ci/ml) durante 8, 12, 24, 48 y 72 horas. La utilización de un medio de cultivo pobre en inositol (el Ham F-10), permitió disminuir a 5  $\mu$ Ci/ml la cantidad de isótopo y obtener, no obstante, una buena incorporación del azúcar a la molécula del PI-glicano.

Tal incorporación fue máxima a las 24 horas y se mantuvo constante hasta 3 días después de iniciado el cultivo.

d) Incorporación de [<sup>3</sup>H]manosa a la molécula de PI-glicano

La [<sup>3</sup>H]manosa (25 $\mu$ Ci/ml) se mantuvo en el cultivo de células granulosa ( $10^6$  células/placa) durante 5, 24, 48 ó 72 horas.

Extraído el glicofosfolípido y purificado por cromatografía en capa fina, no pudo observarse, tal y como aparece representado en la Fig 8, una incorporación apreciable del azúcar a su molécula en ninguno de los tiempos estudiados.

### 3.- IDENTIFICACION PARCIAL DE LA ESTRUCTURA DE LA CABEZA POLAR DEL FOSFATIDILINOSITOL GLICANO

#### a) Hidrólisis ácida del PI-glicano

Para demostrar que la radioactividad asociada al PI-glicano, tras la incubación con los distintos azúcares radioactivos, no procede de la metabolización de dichos azúcares y su posterior incorporación a la molécula, se sometió al PI-glicano extraído de las células y purificado en CCF, al tratamiento con HCl en la forma en la que se describe en Material y Métodos. Este tratamiento rompe a la molécula en su componentes.

En las Fig 9 y 10 se muestra que tras la cromatografía en capa fina del producto de la hidrólisis, la radioactividad aparece asociada casi exclusivamente con la glucosamina o con la galactosa, dependiendo del tipo de marcaje inicial. No obstante, en el caso del lípido previamente marcado con glucosamina, un porcentaje no desdeñable de la radioactividad total ( $\approx 25\%$ ) aparece ligado a la forma acetilada de la glucosamina.

Idénticos resultados se obtienen cuando las células se marcan con [ $^3$ H]inositol.

#### b) Tratamiento con ácido nitroso

El tratamiento con ácido nitroso separa el grupo amino de la molécula de los aminoazúcares, y rompe cualquier enlace glucosídico existente en el carbono adyacente a aquél en el cual se encuentra el grupo amino (216).

En las Fig 11 y 12 se representan los resultados obtenidos al tratar fosfatidilinositol glicano, previamente marcado con [ $^3\text{H}$ ]glucosamina (Fig 11) o [ $^3\text{H}$ ]galactosa (Fig 12) y purificado con ácido nitroso, en la forma y tiempo descritos en Material y Métodos.

Como puede observarse en las Figs 11 y 12, entre un 30 y un 35 % de la radioactividad asociada a la molécula de PI-glicano desaparece tras el tratamiento con el ácido nitroso.

#### 4.- IDENTIFICACION PARCIAL DE LOS COMPONENTES Y ESTRUCTURA DEL ESQUELETO DEL FOSFATIDILINOSITOL GLICANO

##### a) Incorporación de [ $^3\text{H}$ ]palmitato al PI-glicano

En la Fig 13 se representan los resultados obtenidos al incubar células granulosa con 5  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]palmitato, durante 4, 8, 24, 48 ó 72 horas, tras lo cual el lípido fue extraído, cromatografiado y contado.

A las ocho horas de incubación con [ $^3\text{H}$ ]palmitato, se obtuvo la máxima incorporación (aproximadamente 60,000 c.p.m.), que se mantuvo casi constante durante tiempos de incubación de hasta 72 horas.

##### b) Incorporación de [ $^3\text{H}$ ]miristato al PI-glicano

En la Fig 14 se muestra la radioactividad asociada al PI-glicano, tras incubar  $10^6$  células granulosa/ml con 5  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]miristato, durante 5, 24, 48

y 72 horas. Al finalizar los períodos de incubación el lípido fue extraído, cromatografiado y contado.

La mayor incorporación de [ $^3\text{H}$ ]miristato a la molécula del PI-glicano tuvo lugar, en todos los ensayos realizados (una media de tres por experimento), a las 48 h de incubación con el precursor. En tiempos más largos de incubación se produjo una reducción de la radioactividad asociada al lípido, hasta los niveles de la obtenida con sólo 8 horas de incubación con el precursor.

### c) Tratamiento del PI-glicano purificado con $\text{PLA}_2$

Para determinar si los ácidos grasos incorporados a la molécula del glicofosfolípido se encuentran esterificados con el alcohol del carbono 2 o, por el contrario, han sido metabolizados y se han incorporado inespecíficamente a la molécula del PI-glicano, se sometieron muestras del lípido purificado y marcado con [ $^3\text{H}$ ]miristato o [ $^3\text{H}$ ]palmitato a incubación con  $\text{PLA}_2$  en la forma y tiempo que se describe en Material y Métodos. La  $\text{PLA}_2$  rompe específicamente el enlace éster del carbono 2 y transforma el lípido en un lisofosfolípido.

Tras el tratamiento con el enzima (Figs 15 y 16), la mayor parte de la radioactividad asociada al glicofosfolípido marcado con [ $^3\text{H}$ ]palmitato desaparece en la cromatografía realizada a la fase orgánica (Fig 15). En cambio, un gran pico de radioactividad aparece con el mismo  $R_f$  que el [ $^3\text{H}$ ]palmitato que se utilizó como patrón en la CCF. Cuando se analizó el efecto de la  $\text{PLA}_2$  sobre el PI-G marcado con [ $^3\text{H}$ ]miristato se encontró que la radioactividad (Fig 16) aparecía en dos picos, uno migrando con los lípidos neutros y el [ $^3\text{H}$ ]miristato usado como patrón, y el otro, menor, en posición similar a la del PI-G.

d) Tratamiento con PLC de los extractos purificados del lípido

La Fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, hidroliza el enlace fosfodiéster del inositol con el diacilglicerol de la molécula del fosfolípido que lo contiene, liberando, en consecuencia, la cabeza polar del lípido y el diacilglicerol. La potencia de hidrólisis de la PLC utilizada fue medida en términos de su capacidad para romper fosfatidilinositol. Sólo el 50% del PI sometido al tratamiento con PLC fue hidrolizado. En la Fig 17 se muestra que un 25% del total de PI-G se hidrolizó tras ser sometido a una incubación con la PLC en el tiempo y forma que se describe en Material y Métodos.

Sin embargo, considerando que la preparación de PLC usada sólo posee una capacidad de hidrólisis del 50%, podría considerarse que alrededor de la mitad del PI-G fue sensible a la hidrólisis con PLC.

5.- EFFECTO DE LAS DIFERENTES HORMONAS REGULADORAS DE LA DIFERENCIACION DE LA CELULA GRANULOSA, EN EL CONTENIDO Y RECAMBIO DEL PI-GLICANO

a) Efecto de la FSH sobre el contenido y recambio del PI-glicano

En la Fig 18, se representan los resultados obtenidos tras administrar a un cultivo de células granulosa ( $10^6$ /placa) FSH (30 ng/ml), 1,200, 300, 60, 30 y 15 segundos antes de terminar el experimento con TCA 5%.

Extraído el glicofosfolípido y purificado por cromatografía en capa fina, tal y como se describe en Material y Métodos, no pudo observarse ningún cambio

significativo en la cantidad de PI-G tras la adición de FSH, en ninguno de los tiempos estudiados.

En la Fig 19, se representan los efectos sobre la cantidad de glicofosfolípido existente en células granulosa, tratadas con FSH (30 ng/ml) o con el análogo sintético del AMPc, el dibutiril AMPc [(Bu)<sub>2</sub>AMPc] (0.5 mg/ml).

La incorporación de cualquiera de los dos agonistas al cultivo, a los tiempos indicados, induce un aumento en el contenido del lípido, que alcanza un máximo de 10 y 15 veces el control respectivamente, a las 48 horas de tratamiento.

La incubación de células granulosa ( $10^6$ /placa) con el activador de la Gs, la coleratoxina (Ctx) (0.5  $\mu$ g/ml), y el (Bu)<sub>2</sub>AMPc (0.5 mg/ml) durante los tiempos indicados en la Fig 20, en presencia de [<sup>3</sup>H]glucosamina (25  $\mu$ Ci/ml), produjo asimismo un aumento en el contenido del lípido que alcanza un máximo a las 72 h, del 440 y 285 % respectivamente, al ser comparado con los controles.

b) Efecto de la insulina sobre el contenido en PI-glicano en células granulosa

Las células granulosa ( $10^6$ /placa), mantenidas en cultivo primario en McCoy's 5a y marcadas con [<sup>3</sup>H]galactosa (25  $\mu$ Ci/ml) fueron tratadas con insulina (1 mU) durante 1,200, 300, 60, 30 ó 15 segundos antes de añadir TCA al cultivo y extraer y purificar el PI-G, como se describe en Material y Métodos.

A los 5 minutos (Fig 21) de iniciado el estímulo pudo observarse una ligera hidrólisis (35%) del lípido, que recupera los niveles basales pasados los 20 minutos de tratamiento con insulina.

c) Efecto del IGF-I sobre el contenido de PI-glicano en células granulosa

Se midieron los efectos del IGF-I sobre el contenido del glicofosfolípido en células granulosa ( $10^6$ /placa) marcadas con [ $^3$ H]galactosa (25  $\mu$ Ci/ml).

El IGF-I (100 ng/ml) se añadió 1,200, 300, 120, 60, 30 ó 15 segundos antes de terminar el experimento con TCA 10%.

Se extrajo y purificó el lípido por cromatografía secuencial silicagel, tal y como se describe en Material y Métodos.

Los resultados, representativos de una serie de al menos tres experimentos, se muestran en la Fig 22. A los cinco minutos de iniciado el estímulo, el IGF-I indujo una desaparición de aproximadamente el 30% del glicofosfolípido que, no recupera sus niveles basales pasados 20 minutos del inicio del experimento.

d) Hidrólisis del PI-glicano de células granulosa por hCG

La hCG (100 ng/ml) fue añadida en tiempos decrecientes a células granulosa, indiferenciadas o tratadas con FSH (30 ng/ml) durante 48 h para obtener su diferenciación y la expresión de los receptores a LH/hCG (Fig 23). Al igual que en experimentos precedentes, la FSH produjo un aumento de aproximadamente 6 veces en la cantidad del lípido marcado con [ $^3$ H]galactosa presente en las células diferenciadas con respecto a las indiferenciadas.

La hCG indujo una rápida (60 segundos) y pronunciada (50%) desaparición del lípido, que recuperó sus niveles basales transcurridos cinco minutos de la

iniciación del estímulo. Tal efecto fue observado únicamente en las células diferenciadas.

e) Efecto del EGF en el contenido de PI-glicano de la célula granulosa ovárica

Las células granulosa ( $10^6$ /placa), fueron marcadas con [ $^3$ H]galactosa (25  $\mu$ Ci/ml). El EGF (10 ng/ml) se añadió 1,200, 300, 60, 30 ó 15 segundos antes de terminar el experimento con TCA y extraer y cromatografiar los lípidos como se describe en Material y Métodos.

En la Fig 24 se representan los resultados obtenidos, que no muestran variación significativa en el contenido del PI-glicano en respuesta al estímulo con EGF.

f) Efecto del GnRH en el contenido de PI-glicano de célula granulosa ovárica

El GnRH ( $10^{-7}$  M) se añadió a tiempos decrecientes, desde 1,200 a 15 segundos, a células granulosa ( $10^6$ /placa) marcadas con [ $^3$ H]galactosa (25  $\mu$ Ci/ml).

Tras ser extraído y purificado, el PI-glicano se contó y los resultados se representan en la Fig 25.

En ninguno de los tiempos estudiados, el estímulo de la célula con GnRH produjo cambios significativos de su contenido en PI-G.

g) Efecto de la Prolactina sobre el contenido de PI-glicano de células granulosa

Las células granulosa ( $10^6$ /placa) fueron previamente diferenciadas, mediante el tratamiento con 0.5 mg/ml de  $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$  durante 48 h, y marcadas simultáneamente con [ $^3\text{H}$ ]galactosa (25  $\mu\text{Ci/ml}$ ).

La prolactina (2  $\mu\text{g/ml}$ ) se añadió, tanto a cultivos de células diferenciadas como indiferenciadas, en tiempos de 300, 60, 30 y 15 segundos, antes de detener el experimento con TCA, extraer y purificar el glicofosfolípido.

Tras una pequeña (22%) y rápida (30") disminución en la cantidad del PI-G después del estímulo con prolactina (Fig 26), se produjo un aumento del 60% en el lípido que volvió a los niveles basales pasados 5 minutos.

El efecto de la prolactina pudo observarse igualmente en las células indiferenciadas, si bien fue más rápido (15"), menos dramático (30% de aumento), y sin el descenso inicial en el contenido del PI-glicano.

6.- EFFECTO DEL FOSFOOLIGOSACARIDO SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA  $3\beta$ -HIDROXIESTEROIDE-DESHIDROGENASA  $\Delta^4$ - $\Delta^5$  ISOMERASA

En la Figura 27 se muestra el efecto del fosfooligosacárido (POS) obtenido de PI-G de hígado de rata, a diferentes concentraciones, sobre la actividad de  $3\beta$ -HSD de células granulosa mantenidas en cultivo ( $10^6$ /placa) en medio McCoy's 5a modificado, en ausencia (controles) y presencia de POS (1, 5 y 10 nM), durante 48 horas. Al final del período de cultivo se realizó el ensayo de

la actividad del enzima tal y como se detalla en Material y Métodos. El POS produjo una inhibición dosis-dependiente de la actividad del enzima que es máxima ( $\approx 69\%$ ) a la concentración de 10 nM.

Para comparar los efectos del POS (5 nM) con los de la prolactina (2  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la actividad del enzima  $3\beta\text{-HSD}$  basal, e inducida por FSH/AMPC, se cultivaron  $10^6$  células granulosa/placa, en McCoy's 5a, durante el tiempo necesario (48 h) para obtener una inducción del enzima con  $(\text{Bu})_2\text{AMPC}$  (0.5 mg/ml). En la Figura 28, se representan los resultados obtenidos, en porcentaje con respecto a la actividad de las células no sometidas a ningún tratamiento. En las células indiferenciadas el POS, inhibe la actividad del enzima ( $\approx 50\%$ ), la escasez de receptores a la hormona, condiciona la existencia de un efecto menor ( $\approx 25\%$  de inhibición) de la PRL. La diferenciación de las células granulosa con  $(\text{Bu})_2\text{AMPC}$ , induce en un 125 % la actividad del enzima. La adición simultánea de POS o PRL previene totalmente el aumento de la actividad de  $3\beta\text{-HSD}$  generado por  $(\text{Bu})_2\text{AMPC}$  y disminuye incluso la actividad del enzima a niveles ligeramente inferiores a las células no diferenciadas.

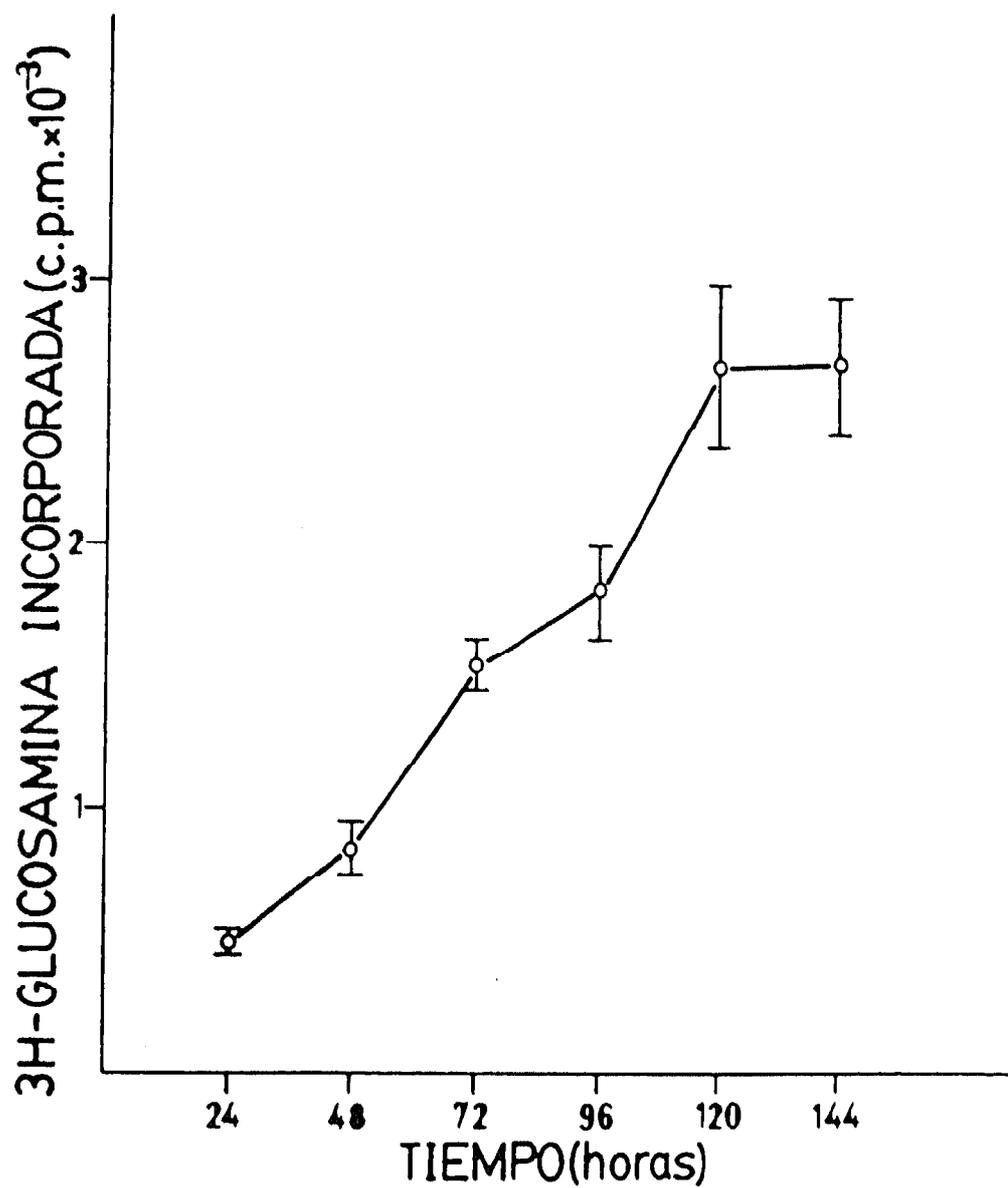


Figura 5.- Incorporación de [<sup>3</sup>H]glucosamina (25 μCi/ml) al PI-glicano contenido en 10<sup>6</sup> células granulosa mantenidas en cultivo primario, en McCoy's 5a modificado, durante los tiempos indicados.

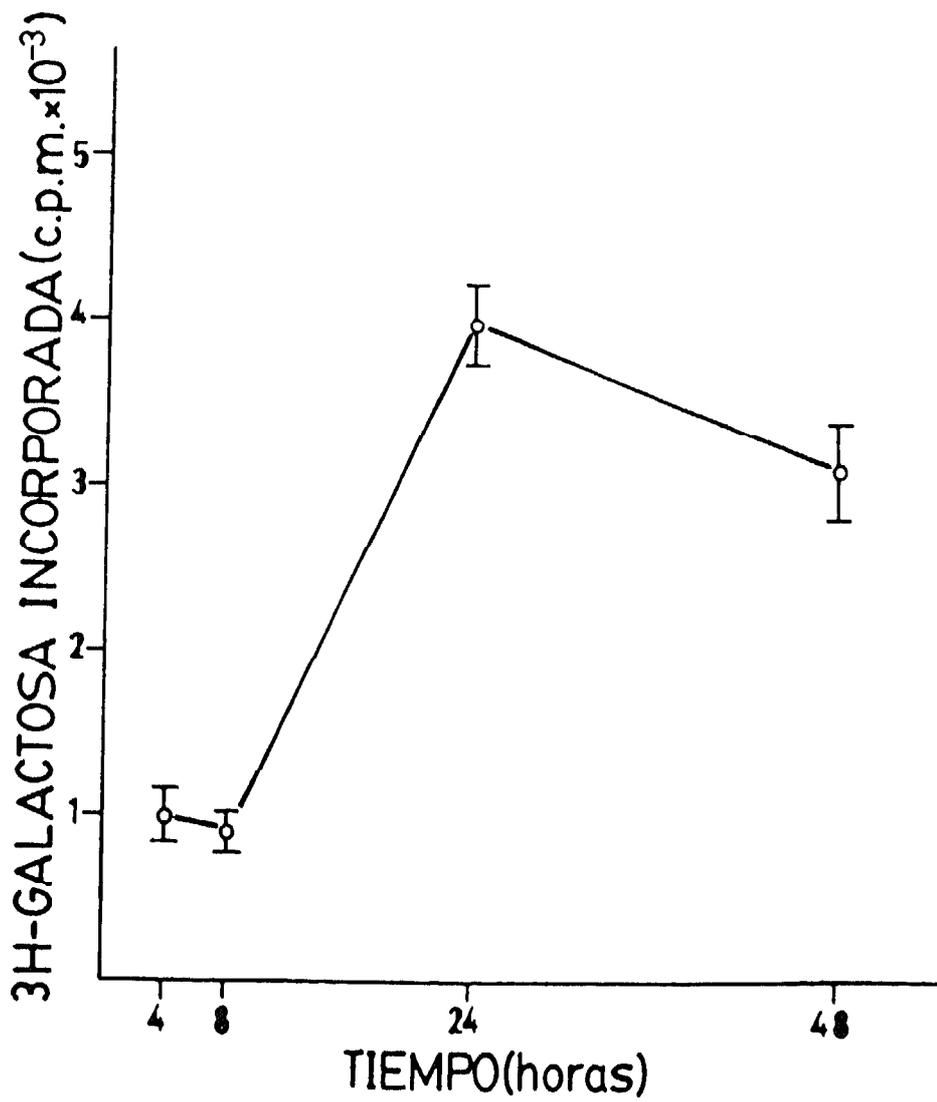


Figura 6.- Incorporación de [ $^3\text{H}$ ]galactosa (25  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) al PI-glicano de las membranas de  $10^6$  células granulosa/placa mantenidas en cultivo primario en Mc Coy's 5a modificado, durante los tiempos indicados.

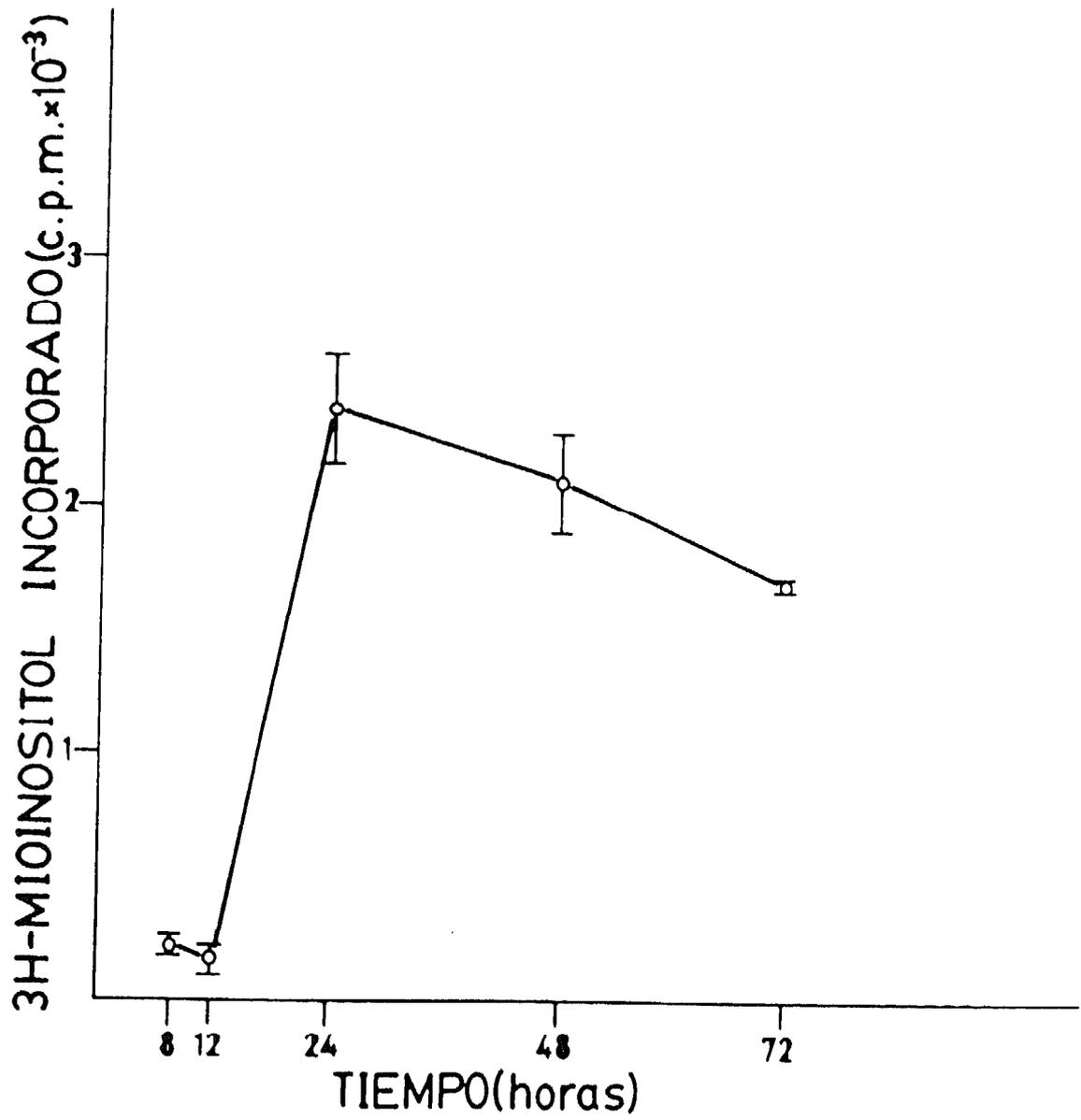


Figura 7.- Incorporación de [<sup>3</sup>H]mioinositol (5 μCi/ml) a células granulosa (10<sup>6</sup>/placa) mantenidas en cultivo primario en Ham F-10, durante los tiempos indicados.

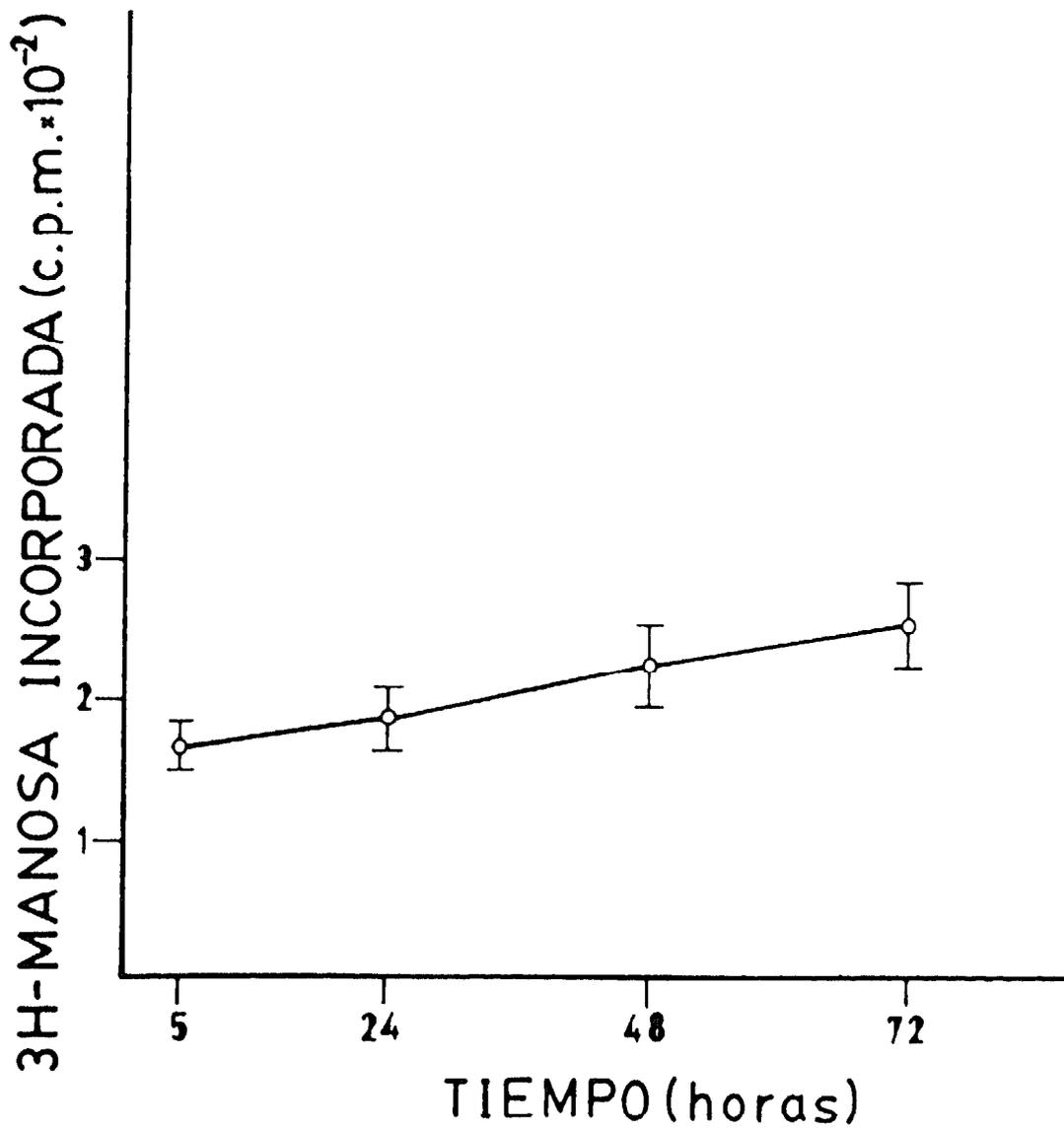


Figura 8.- Incorporación de [ $^3\text{H}$ ]manosa ( $25 \mu\text{Ci/ml}$ ) al PI-glicano contenido en las membranas de  $10^6$  células granulosa mantenidas en cultivo primario, en McCoy's 5a modificado, durante los tiempos indicados.

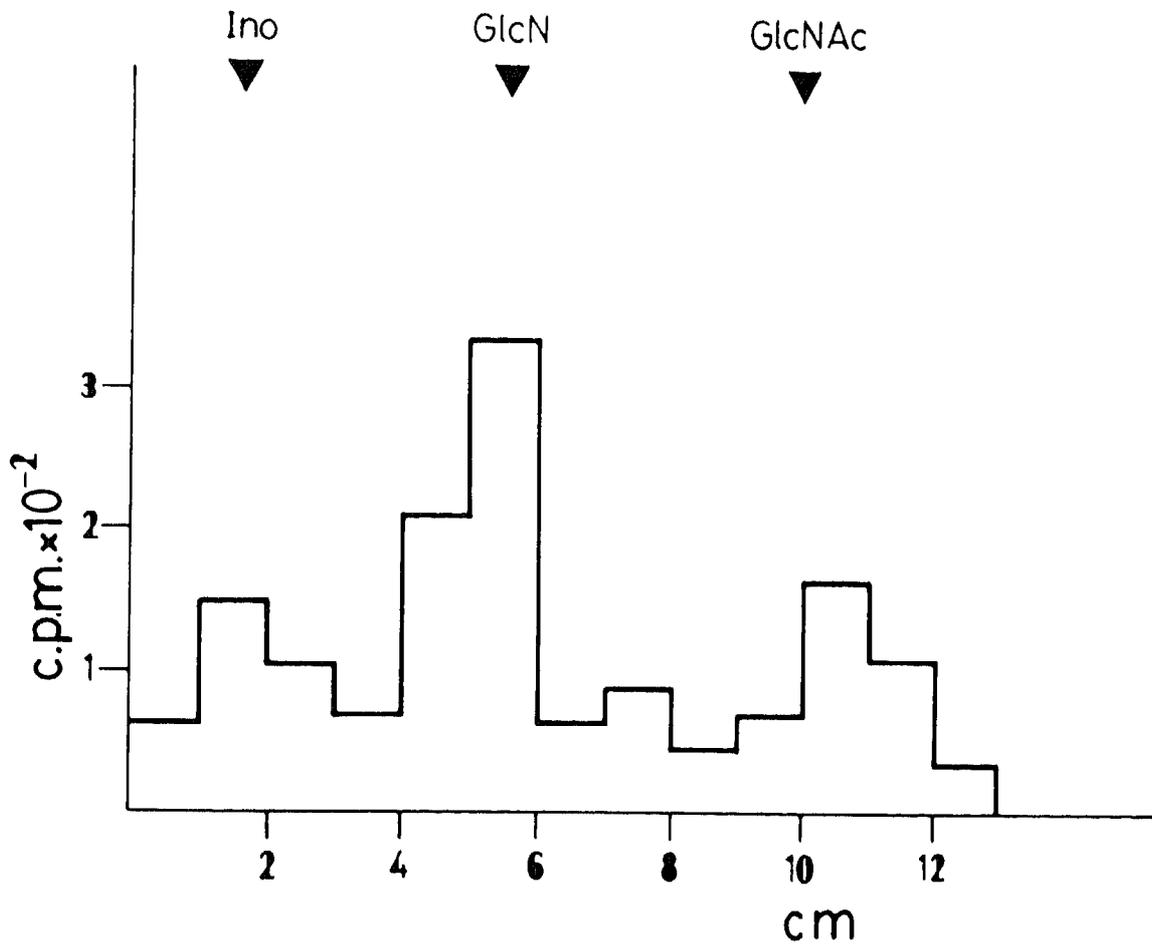


FIGURA 9.- Hidrólisis ácida de la molécula de PI-glicano marcado previamente con [<sup>3</sup>H]glucosamina. Mediante el uso de marcadores se establecía los lugares de migración de las sustancias conocidas. Ino, inositol; GlcN, glucosamina; GlcNAc, N- acetilglucosamina.

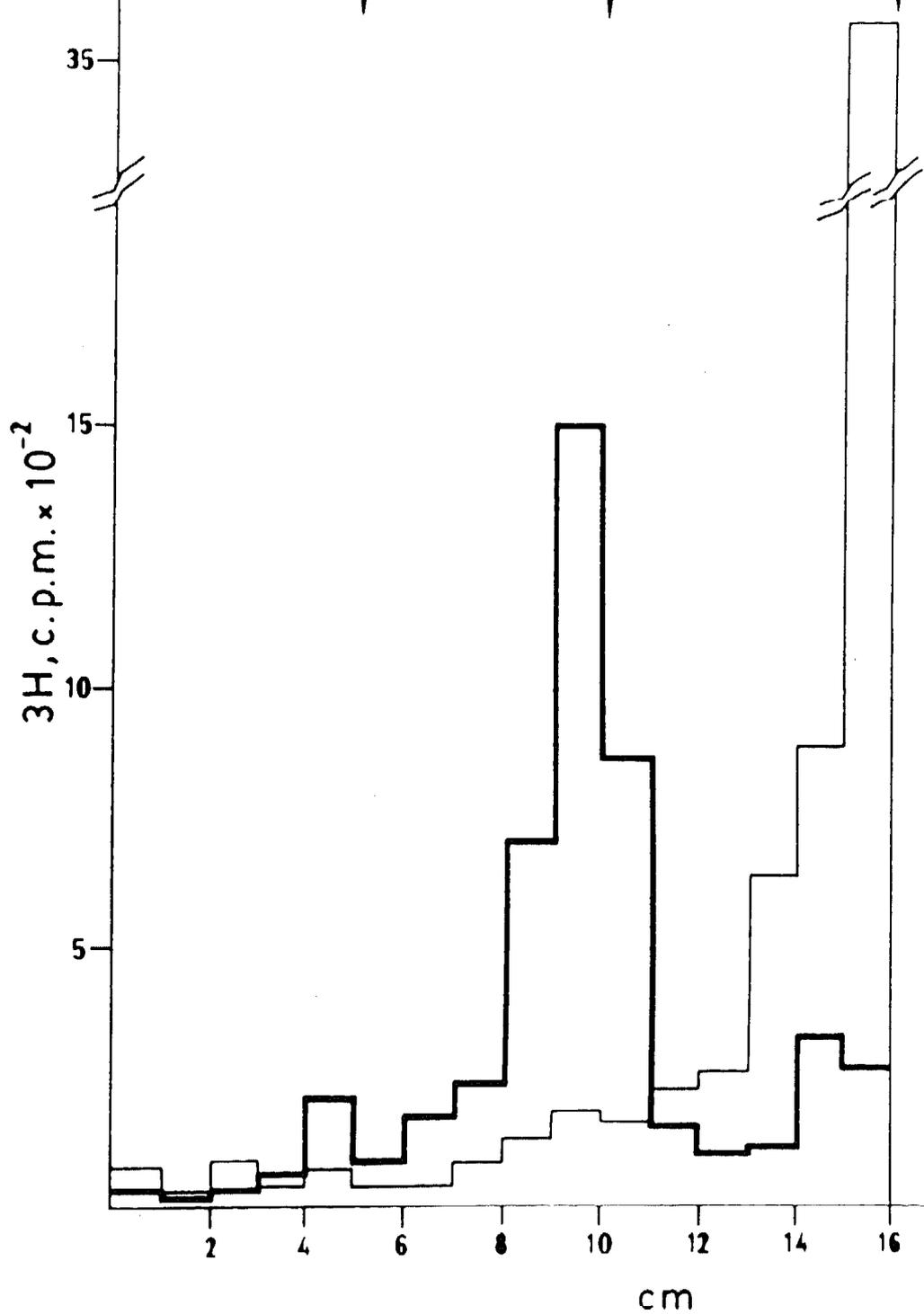


FIGURA 10.- Hidrólisis ácida de la molécula de PI-glicano marcado previamente con [<sup>3</sup>H]galactosa. En trazo débil (—) se muestra la cromatografía del PI-glicano control (no tratado con CIH) y en trazo grueso (—) la del PI-glicano hidrolizado. Ins, inositol; Ga, galactosa; D, dioleína.

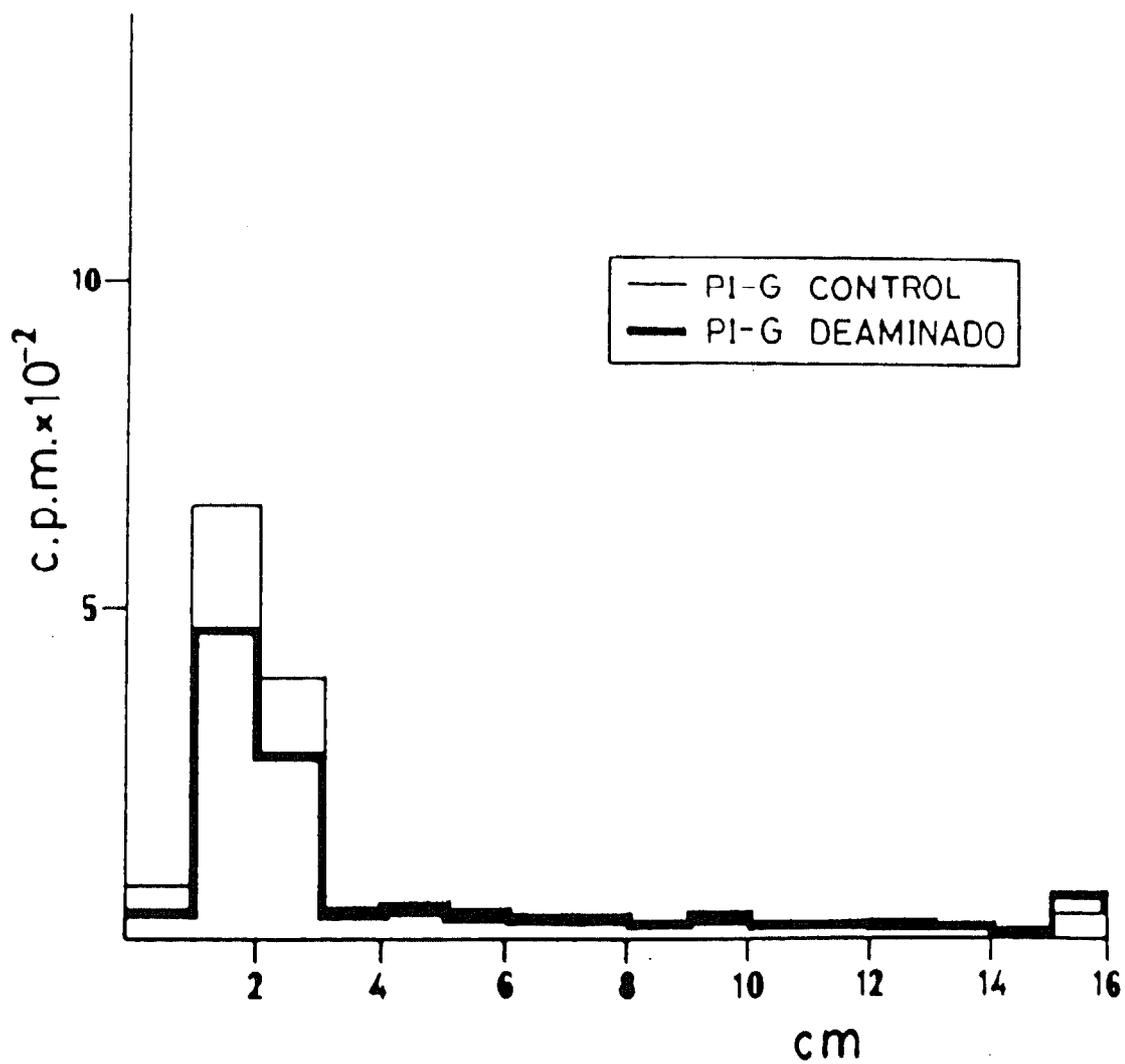


Figura 11.- Tratamiento con ácido nitroso del PI-glicano. Radioactividad asociada a PI-glicano purificado marcado con [<sup>3</sup>H]glucosamina y sometido (—) o no (—) a tratamiento con ácido nitroso, extraído y cromatografiado en el solvente ácido.

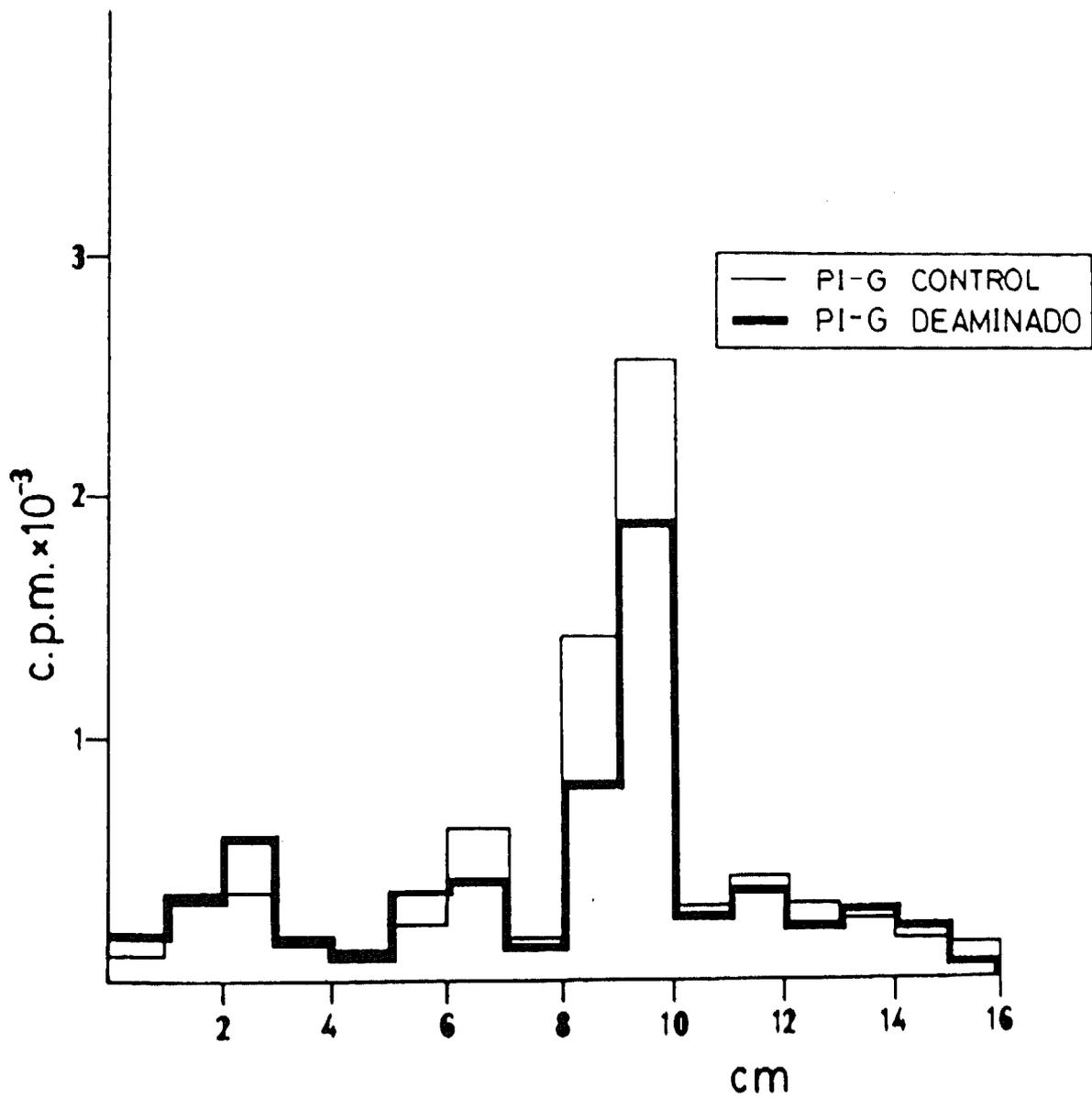


Figura 12.- Radioactividad asociada al PI-glicano marcado con [<sup>3</sup>H]galactosa, extraído y purificado. En trazo débil el control (—), en trazo grueso (—) el lípido sometido a tratamiento con ácido nítrico, en ambos casos cromatografiados en TLC con solvente básico.

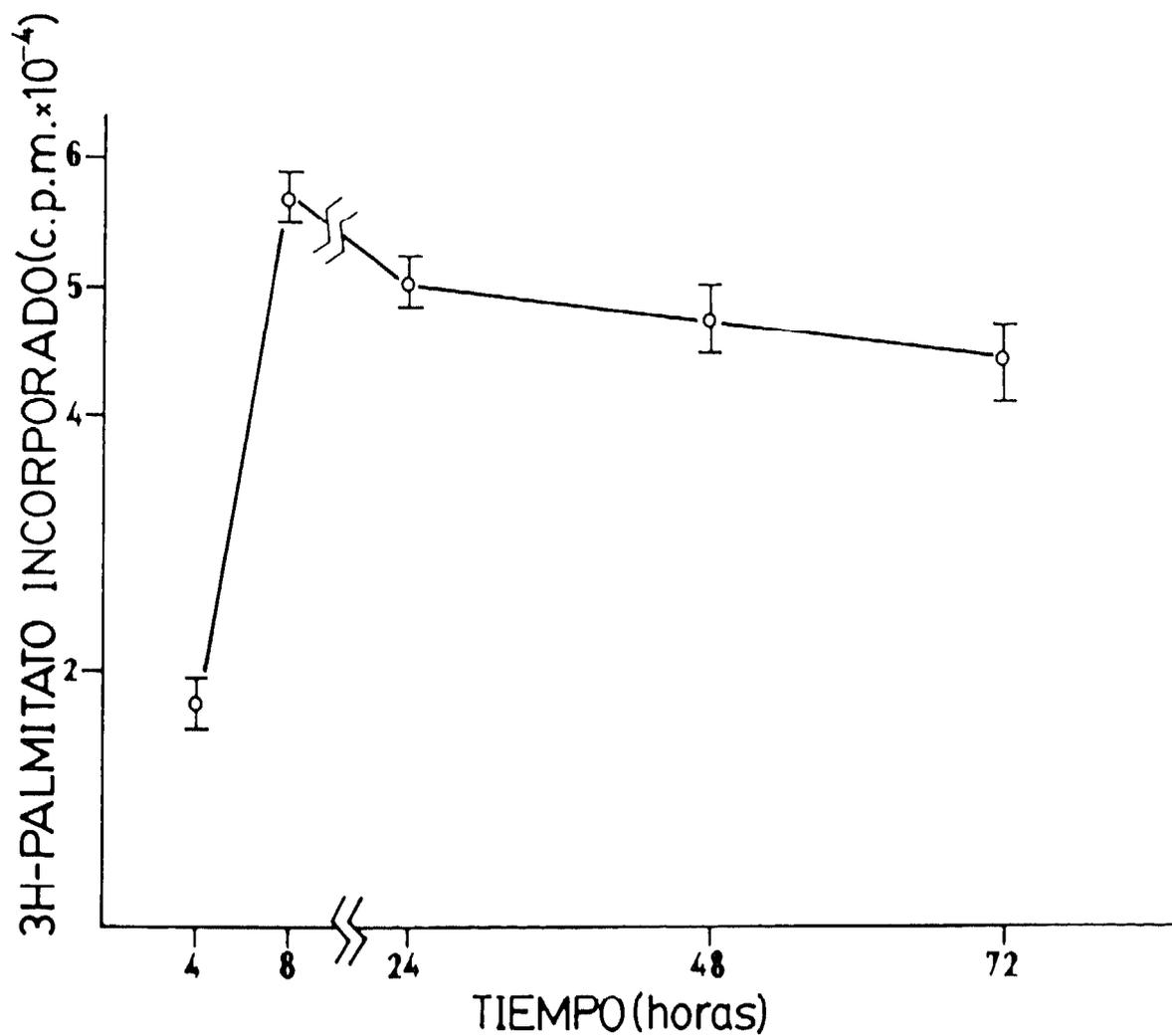


Figura 13.- Incorporación de [<sup>3</sup>H]palmitato (5  $\mu$ Ci/ml) al PI-glicano contenido en  $10^6$  células granulosa, mantenidas en cultivo primario en McCoy'sa modificado, durante los tiempos indicados.

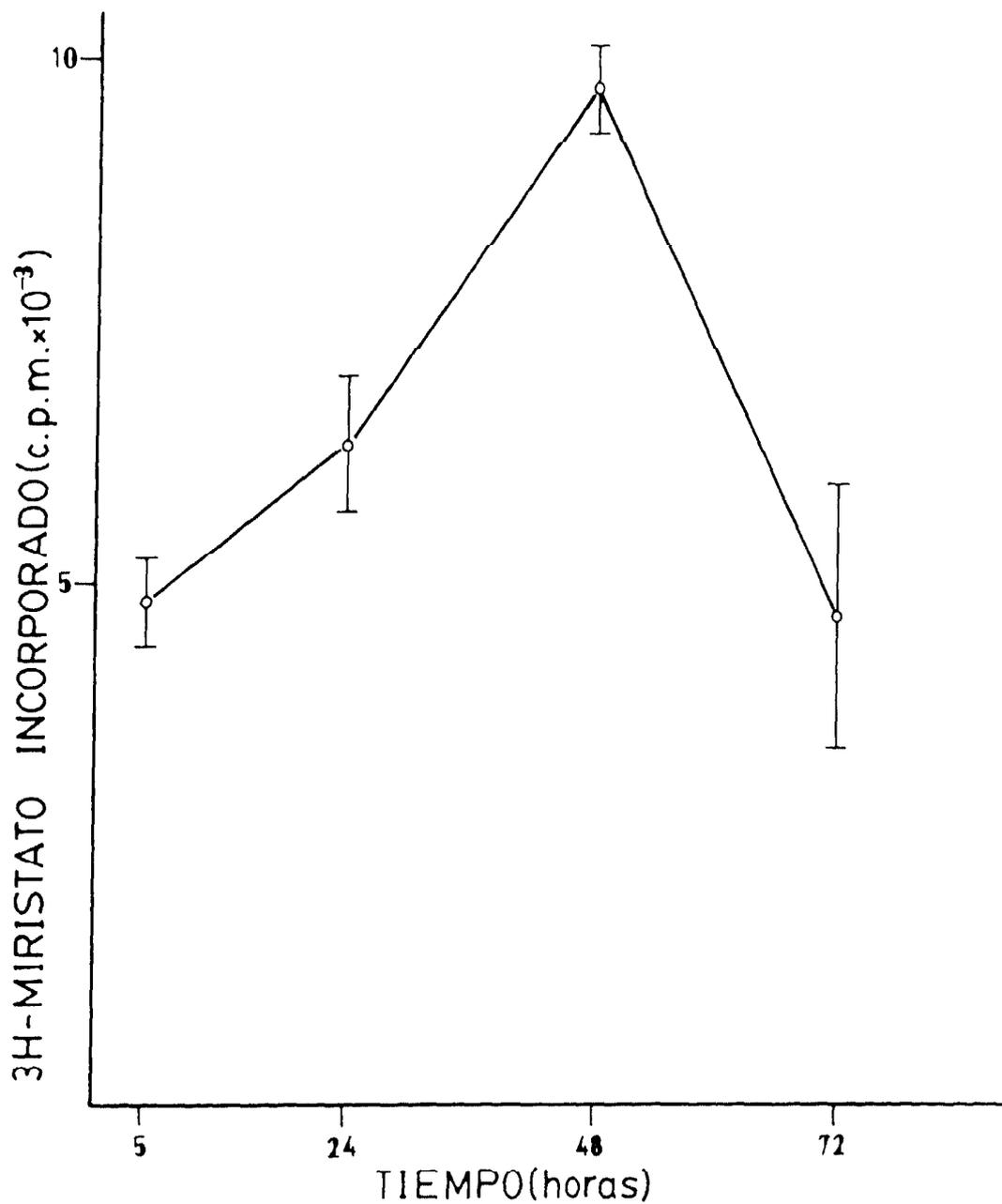


Figura 14.- Incorporación de [ $^3\text{H}$ ]miristato ( $5 \mu\text{Ci/ml}$ ) al PI-glicano de células granulosa ( $10^6/\text{placa}$ ) mantenidas en cultivo primario en McCoy's 5a modificado, durante los tiempos indicados.

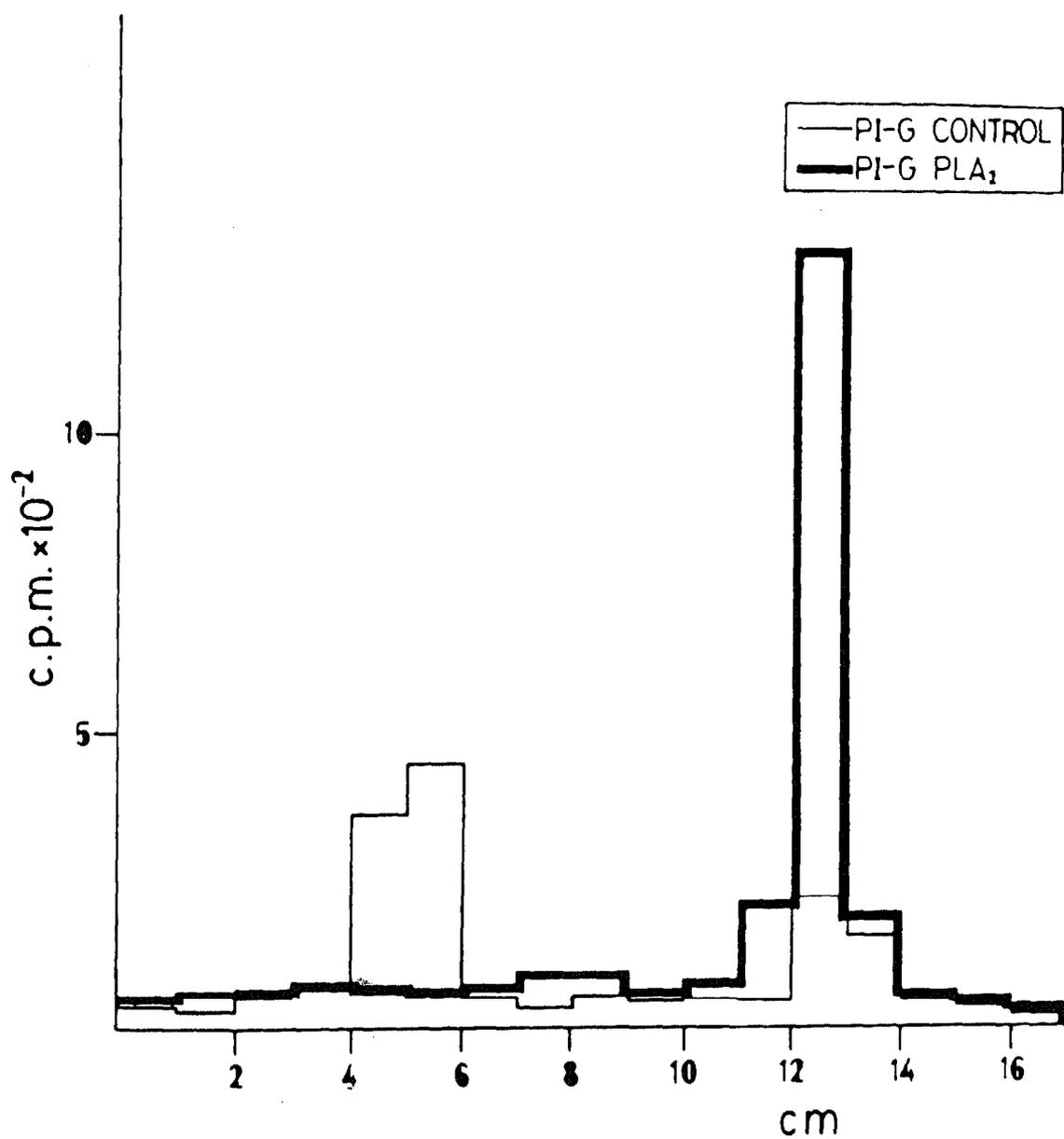


Figura 15.- Hidrólisis con PLA<sub>2</sub> del lípido marcado con [<sup>3</sup>H]-palmitato, extraído y purificado. En trazo débil (—) los controles, en trazo grueso (—) el PI-G tratado.

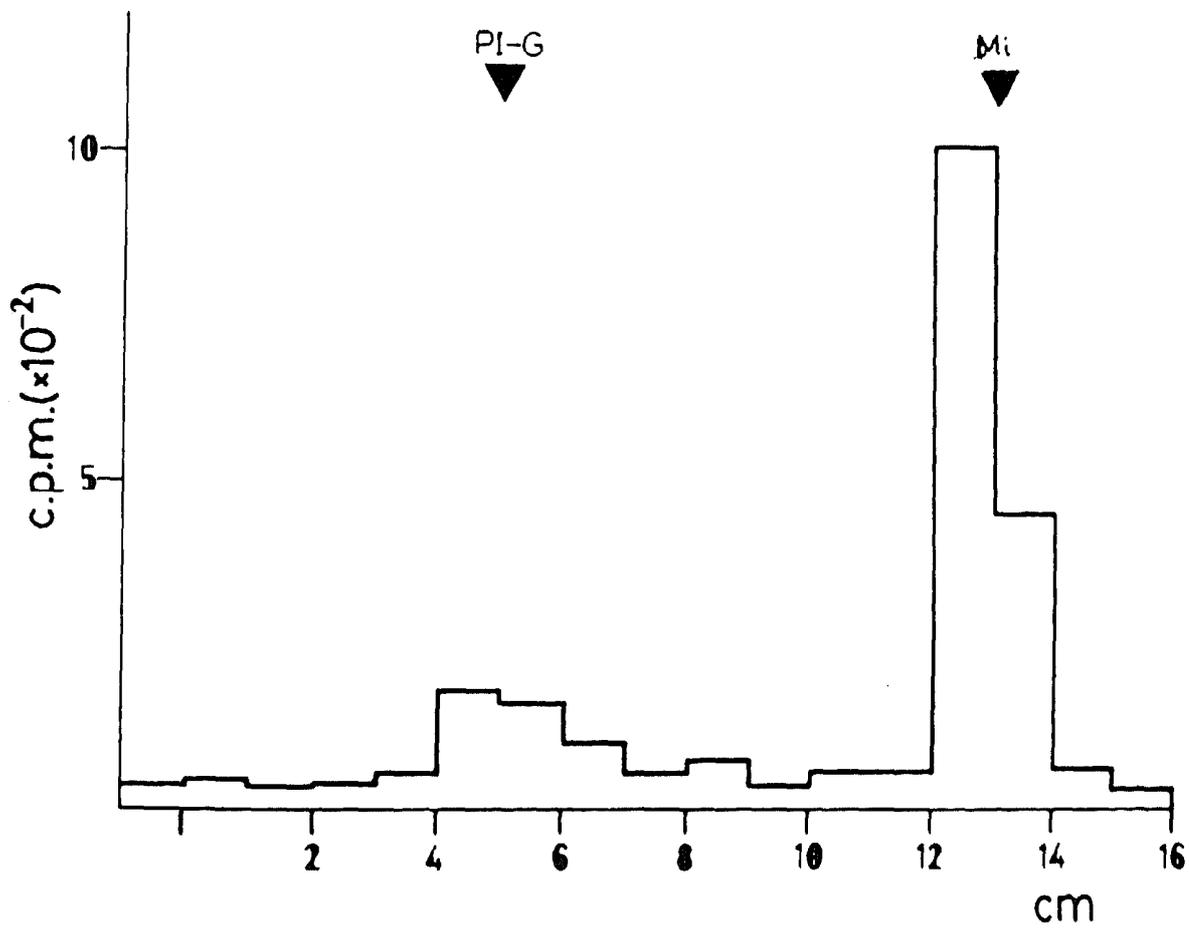


Figura 16.- Hidrólisis con  $\text{PLA}_2$  del fosfolípido marcado con  $[^3\text{H}]$ miristato, extraído y purificado. PI-G, fosfatidilinositol glicano; Mi, miristato

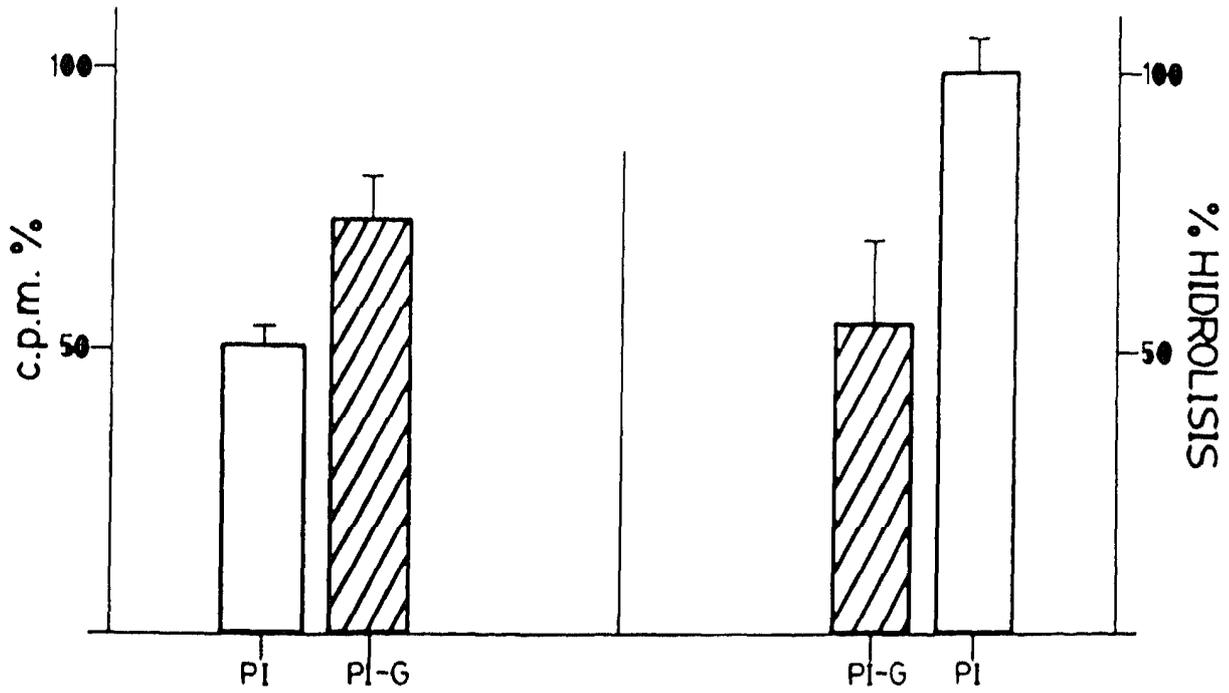


Figura 17.- Hidrólisis con PLC específica de fosfatidilinositol del PI-glicano purificado marcado con [<sup>3</sup>H]palmitato.

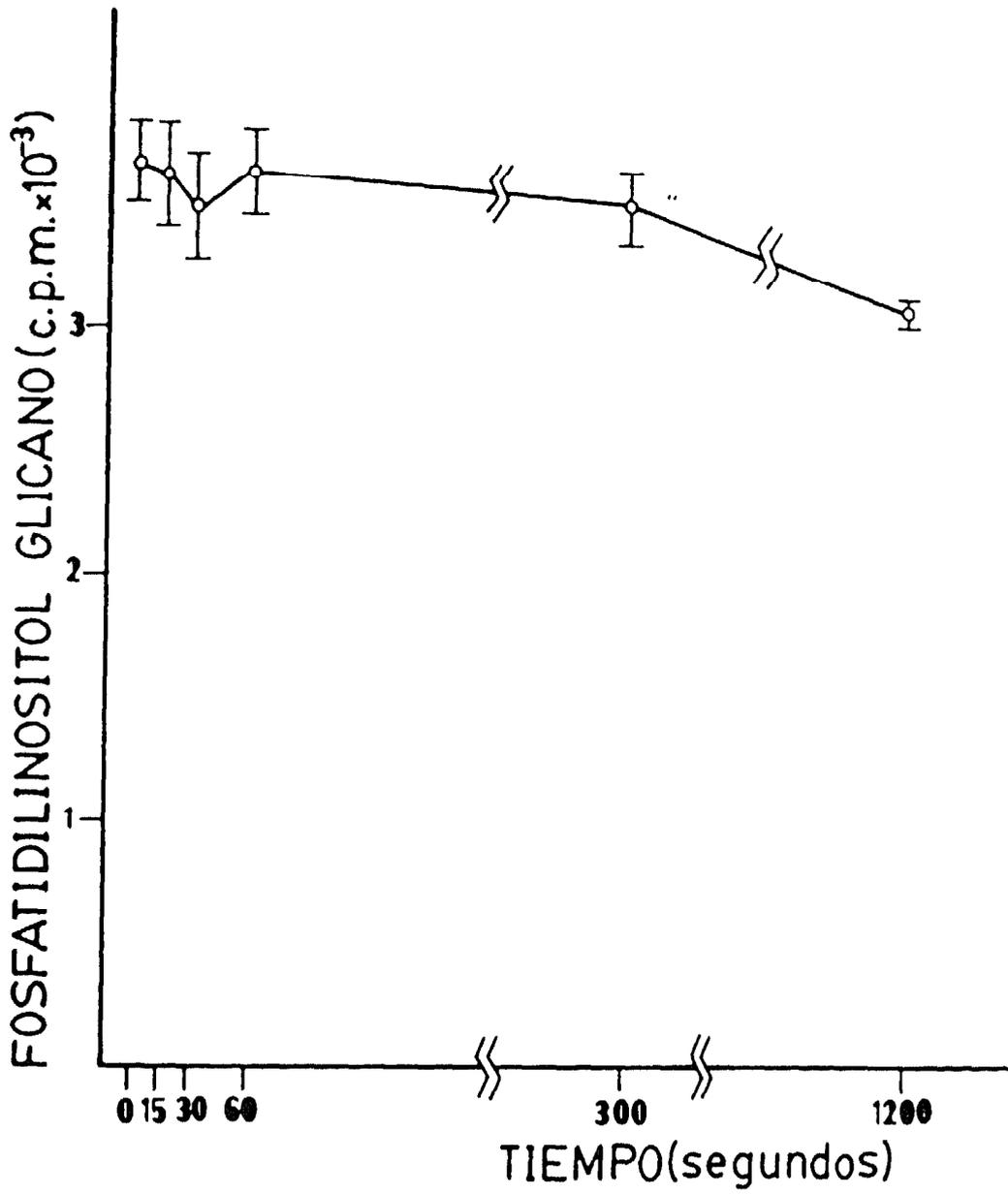


FIGURA 18.- Efecto de la FSH (30 ng/ml), añadida a los cultivos a tiempos decrecientes de 1,200 a 15 segundos, sobre el contenido de PI-glicano aislado de células granulosa (10<sup>6</sup>/placa) marcadas con [<sup>3</sup>H]glucosamina (25 μCi/ml). El experimento es representativo de una serie de al menos tres.

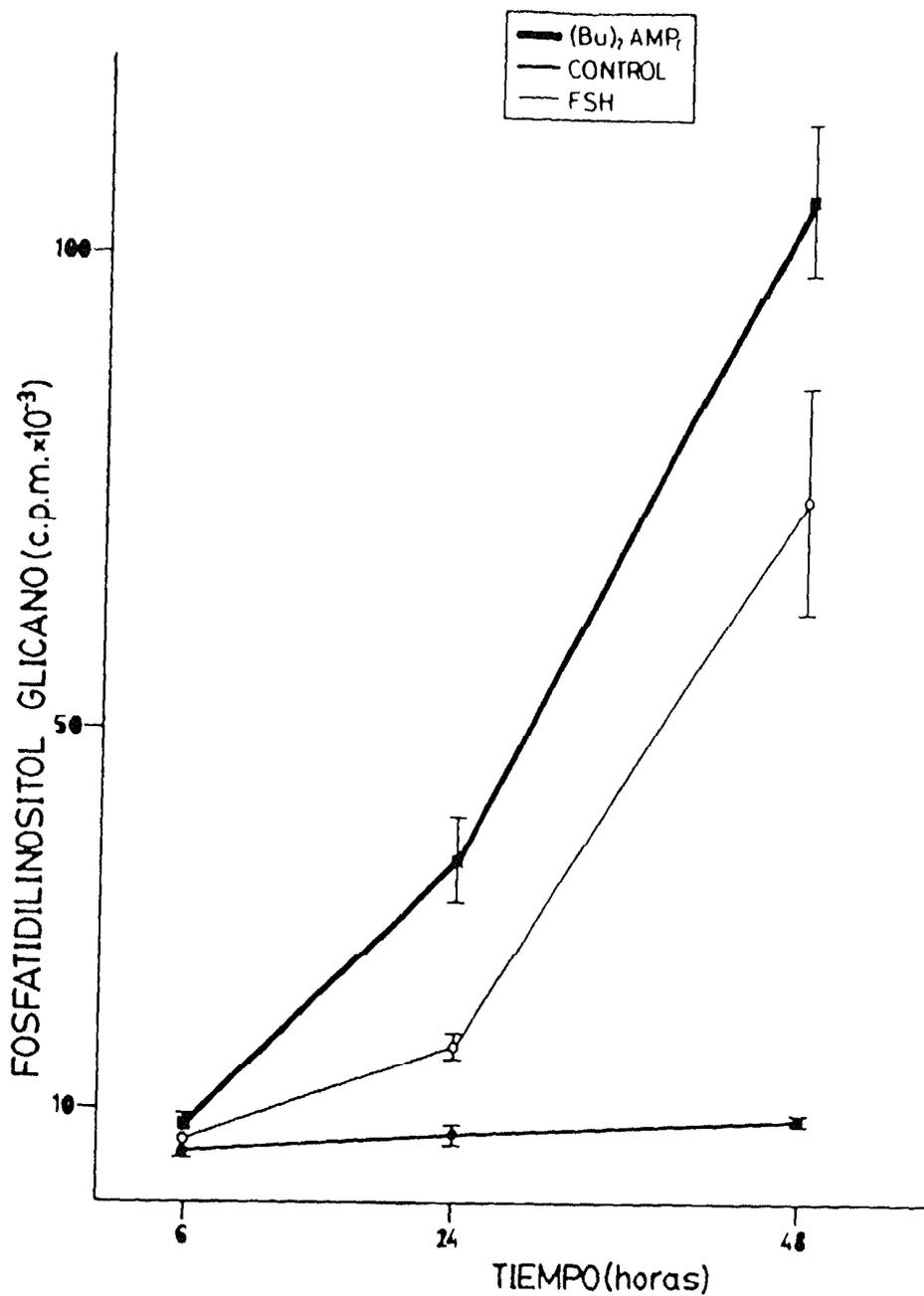


Figura 19.- Efecto de la FSH (30 ng/ml) y del dibutilil AMPc (0.5 mg/ml) sobre el contenido de PI-glicano, aislado de células granulosa (10<sup>6</sup>/placa) marcadas con [<sup>3</sup>H]galactosa (25 μCi/ml). La FSH y el db AMPc fueron añadidos al medio durante los tiempos indicados.

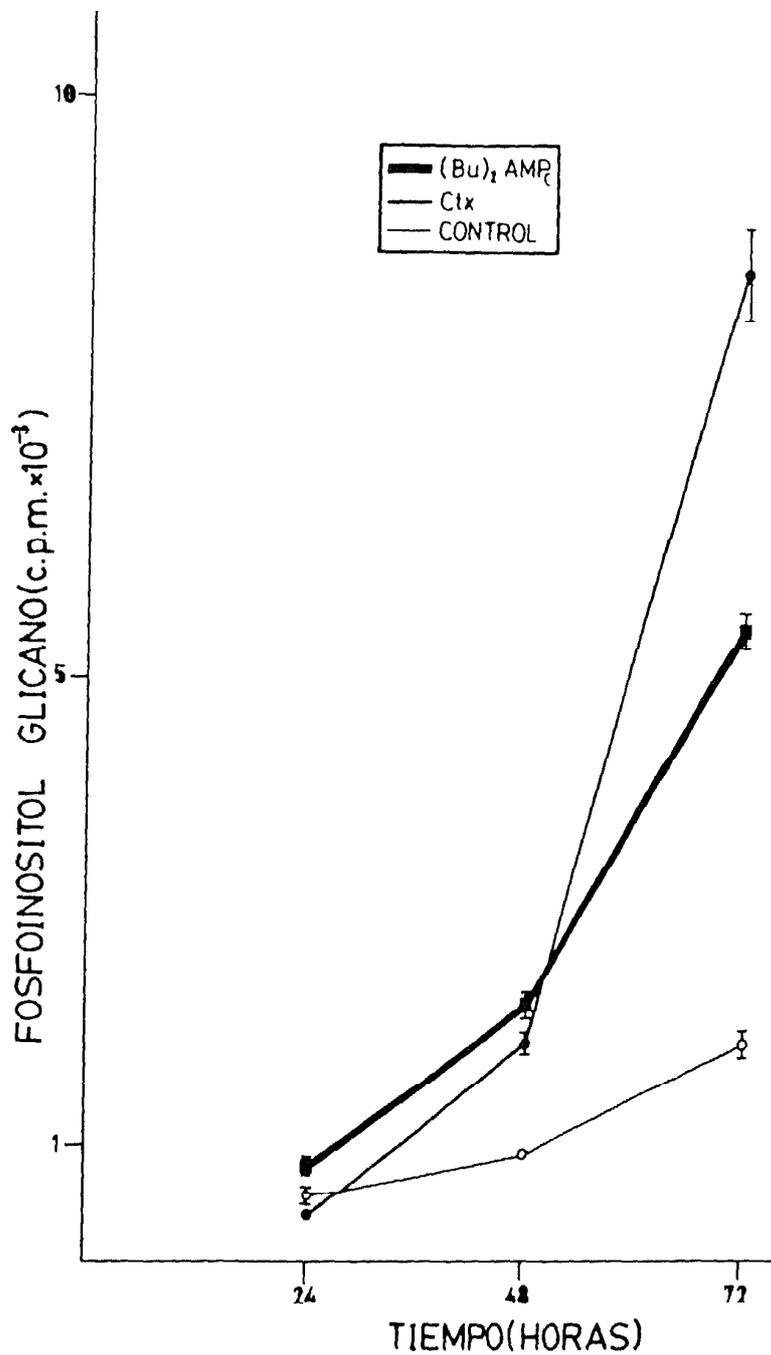


FIGURA 20.- Efecto de la adición, durante los tiempos indicados, de toxina del cólera ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ) y  $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$  ( $0.5 \text{ mg/ml}$ ) al medio de cultivo de células granulosa ( $10^6/\text{placa}$ ) marcadas con [ $^3\text{H}$ ]glucosamina ( $25 \mu\text{Ci/ml}$ ).

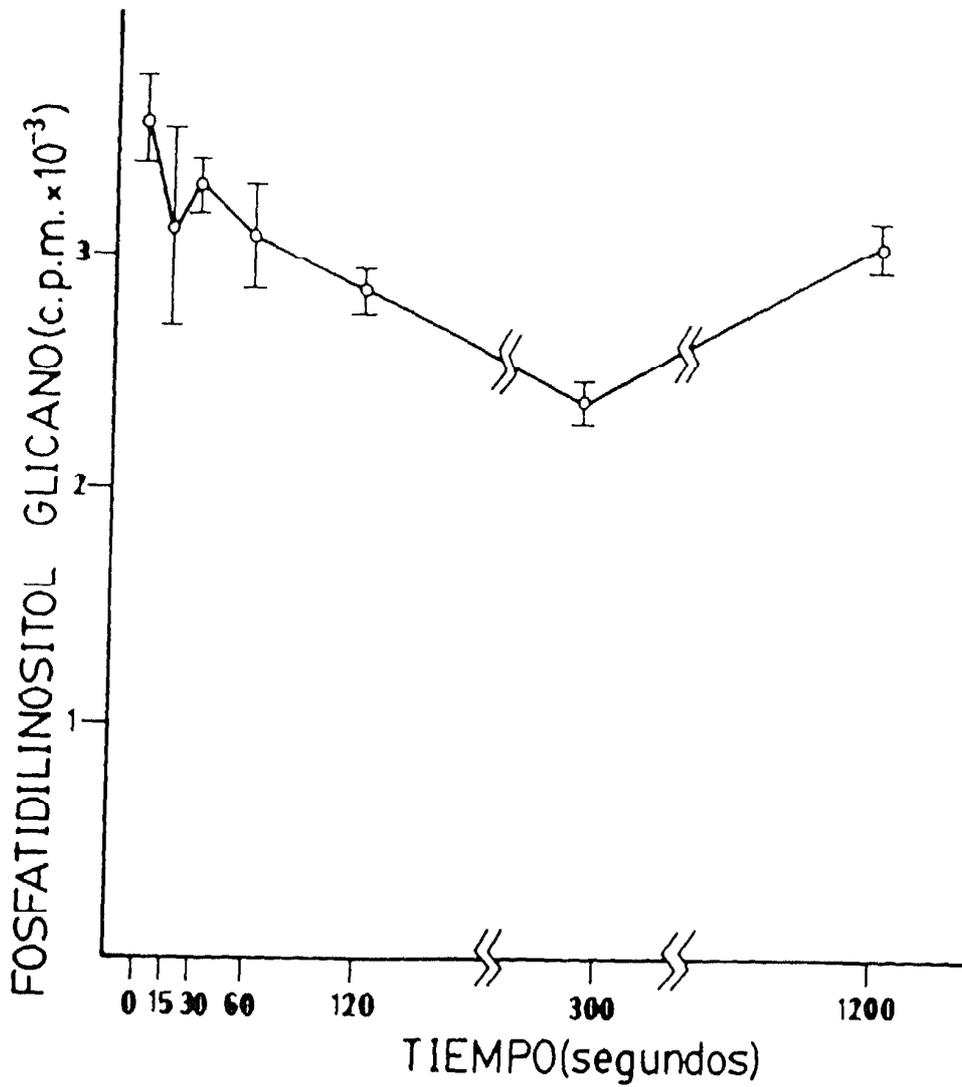


Figura 21.- Hidrólisis del PI-glicano, aislado de células granulosa ( $10^6$ /placa) y marcado con [ $^3$ H]galactosa ( $25 \mu\text{Ci/ml}$ , 48 h), por la insulina ( $1 \text{ mU/ml}$ ) añadida a los cultivos a tiempos decrecientes de 1,200 a 15 segundos. El experimento que se muestra es uno representativo de una serie de al menos tres.

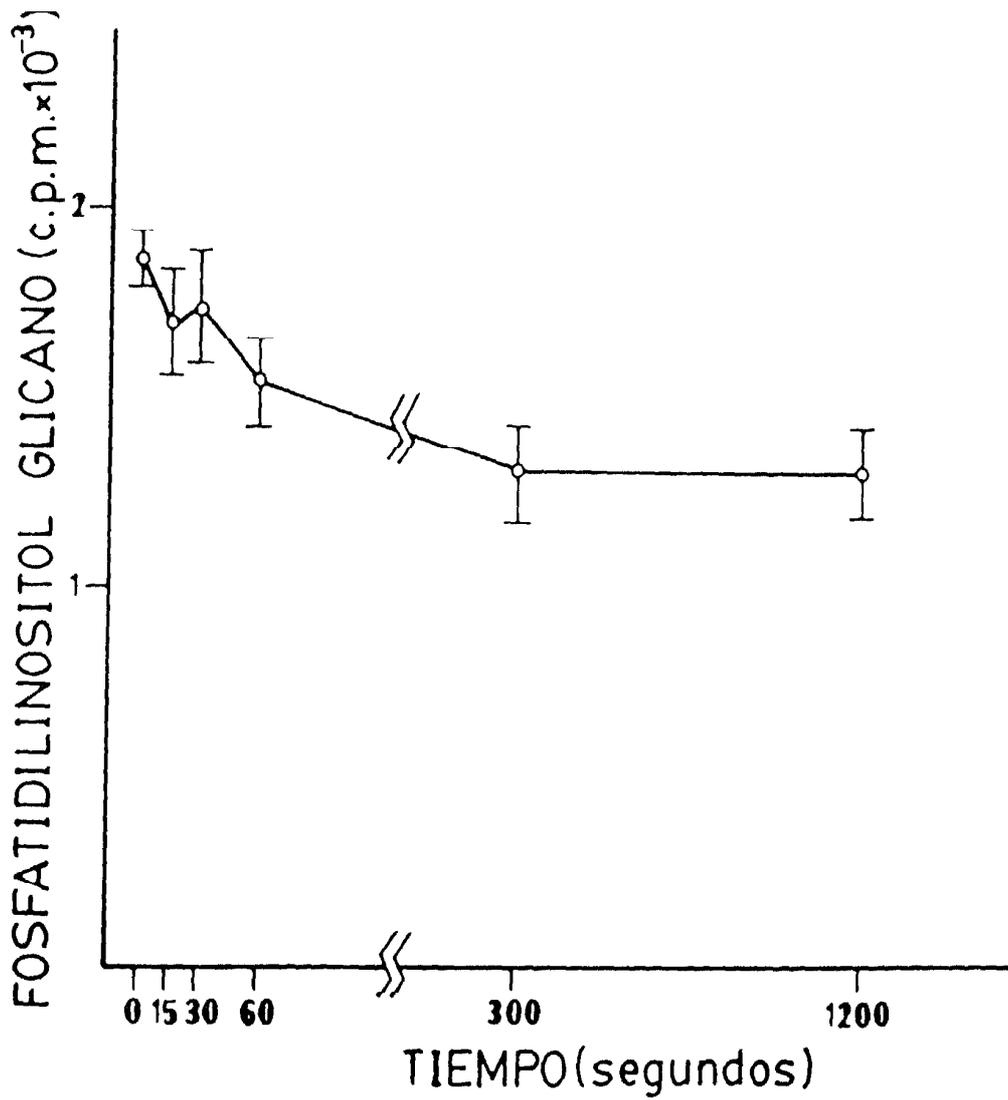


Figura 22.- Hidrólisis del PI-glicano, aislado de células granulosa ( $10^6$ /placa) y marcado con [ $^3$ H]galactosa (25  $\mu$ Ci/ml, 48 h), por el IGF-I (100 ng/ml) añadido a los cultivos a tiempos decrecientes de 1,200 a 15 segundos. Se muestra un experimento representativo de una serie de al menos tres.

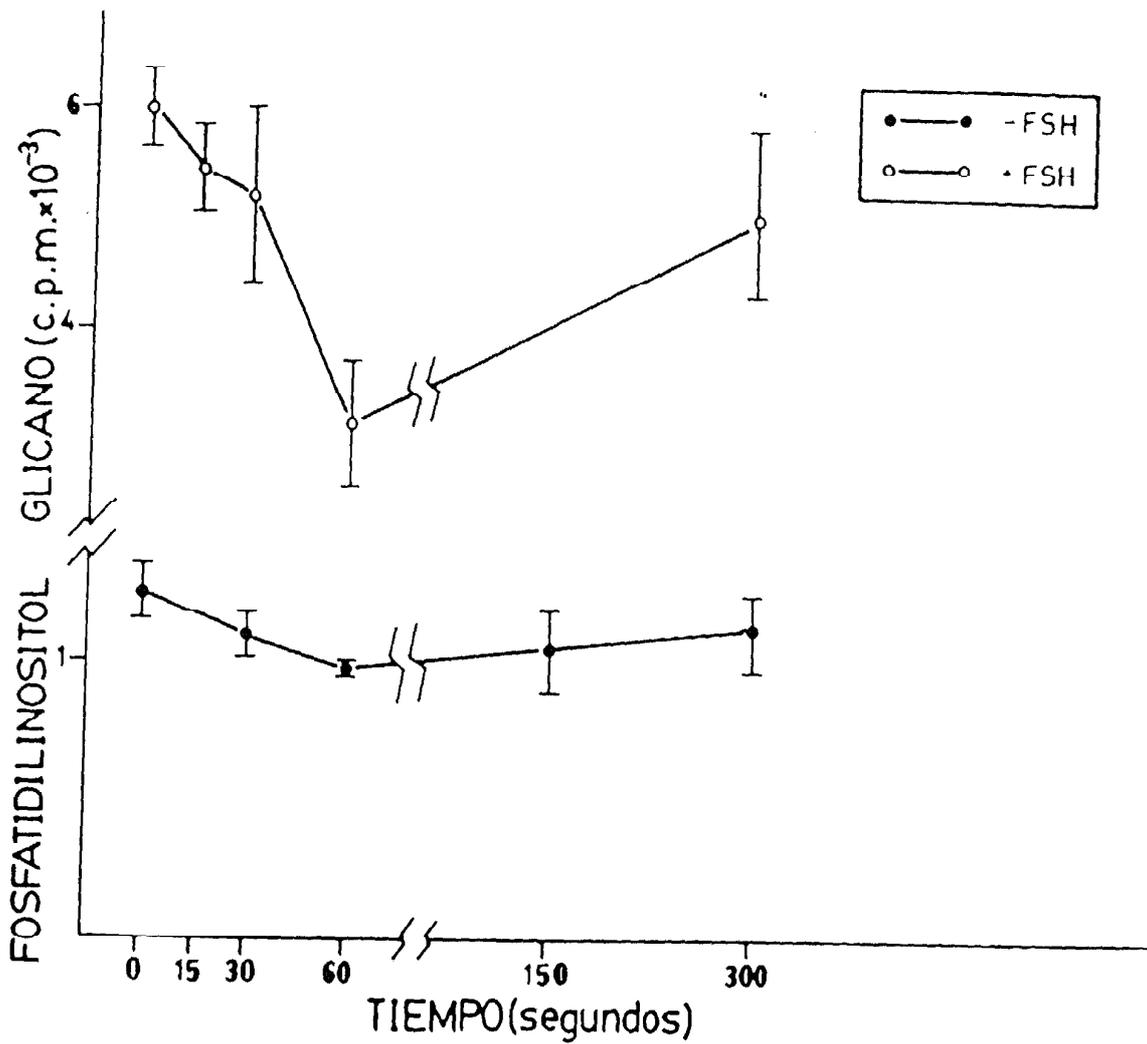


FIGURA 23.- Hidrólisis del PI-G con hCG (100 ng/ml) administrada en tiempos decrecientes (300 a 15 segundos) a cultivos de células granulosa ( $10^6$ /placa) marcadas con [ $^3$ H]galactosa (25  $\mu$ Ci/ml) y pretratadas (○-○) o no (●-●) con FSH (30 ng/ml) para obtener la diferenciación e inducción de receptores a hCG. Se muestra un experimento representativo de una serie de al menos tres.

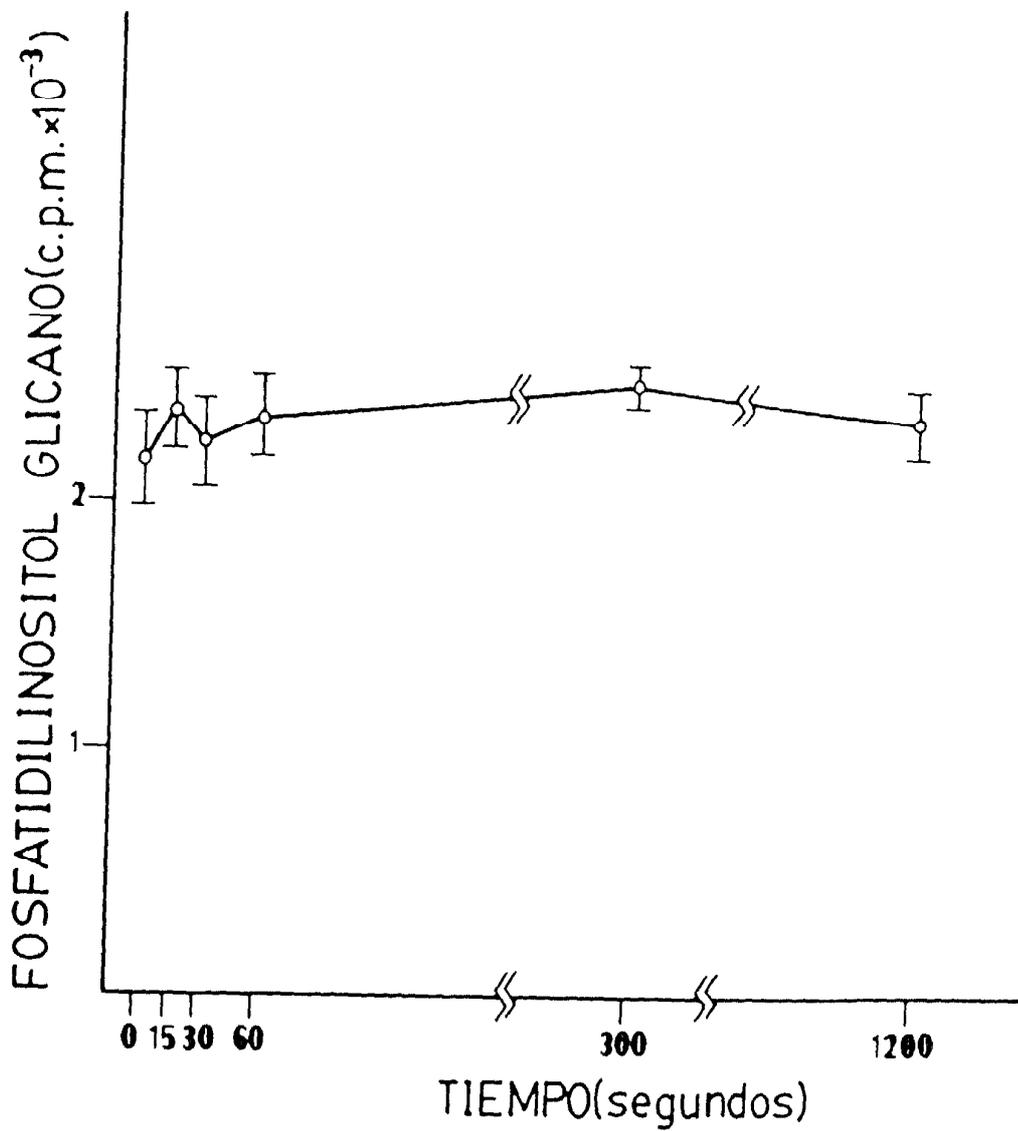


Figura 24.- Efecto del EGF (10 ng/ml) en el PI-glicano marcado con [<sup>3</sup>H]galactosa (25  $\mu$ Ci/ml) y aislado de cultivos de células granulosa ( $10^6$ /placa); tratadas a tiempos decrecientes (20 minutos a 15 segundos) con el EGF. Se muestra un experimento representativo de una serie de al menos tres.

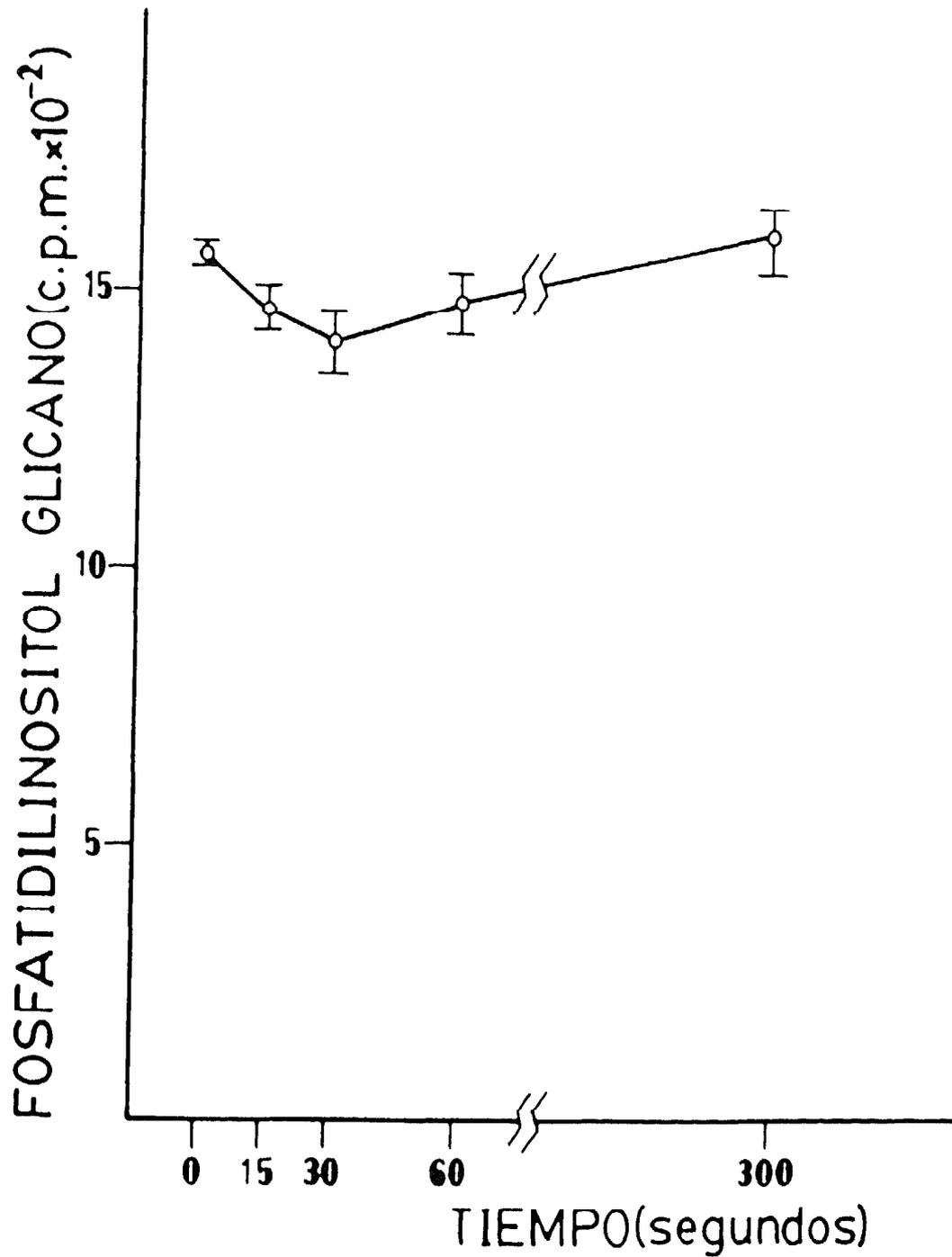


Figura 25.- Efecto de GnRH ( $10^{-7}$  M), añadido a los cultivos a tiempos decrecientes de 1,200 a 15 segundos, sobre el contenido de PI-glicano aislado de células granulosa ( $10^6$ /placa) marcadas con [ $^3$ H]galactosa (25  $\mu$ Ci/ml). Se muestra un experimento representativo de una serie de al menos tres.

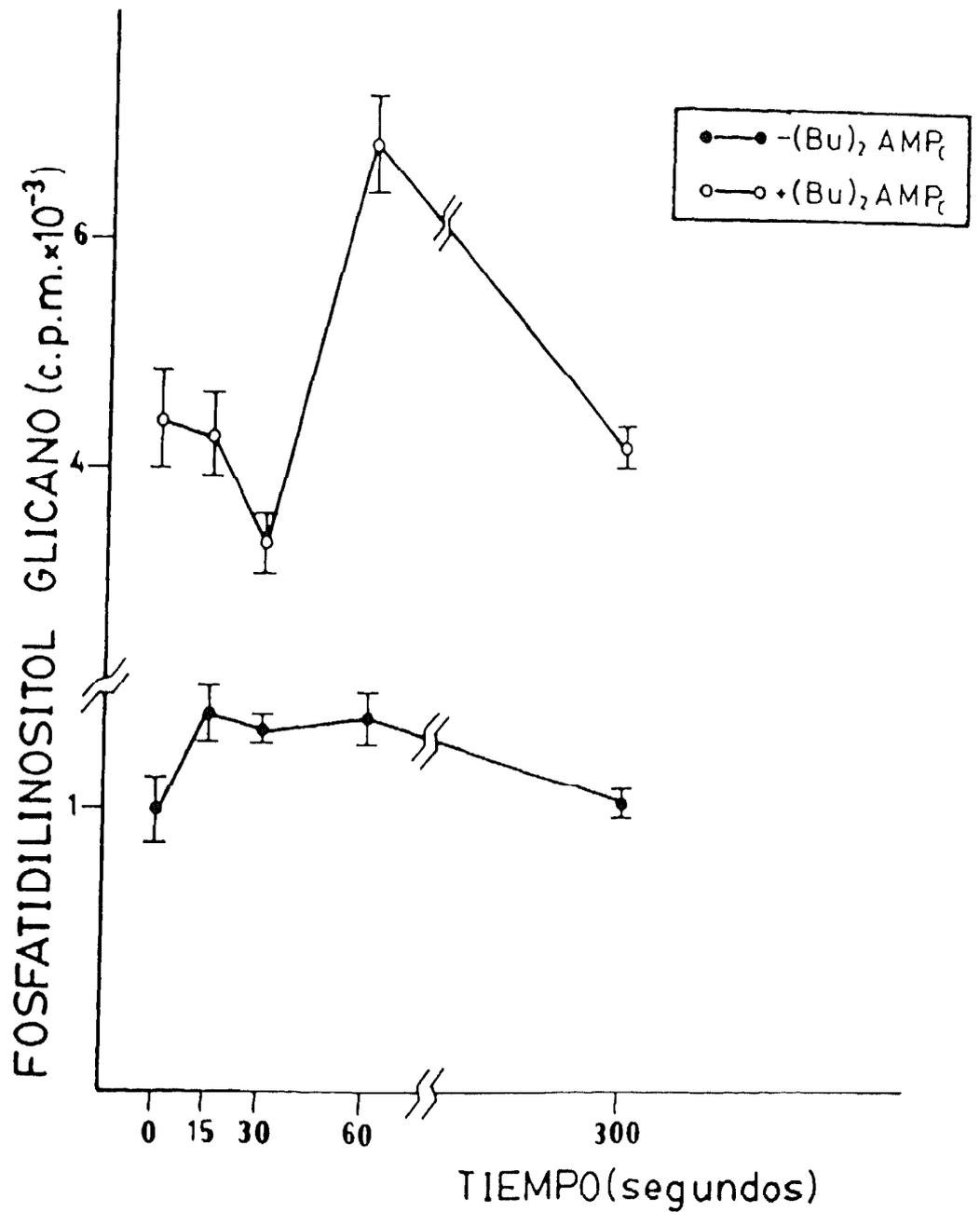


Figura 26.- Efecto de la prolactina (2  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre el recambio de PI-G en células granulosa ( $10^6/\text{placa}$ ) en cultivo. La PRL fue añadida a tiempos decrecientes (300 a 15 segundos) a células granulosa pretratadas (o-o) o no (-o-) con  $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$  (0.5 mg/ml) para obtener la inducción de receptores. Se muestra un experimento representativo de una serie realizada.

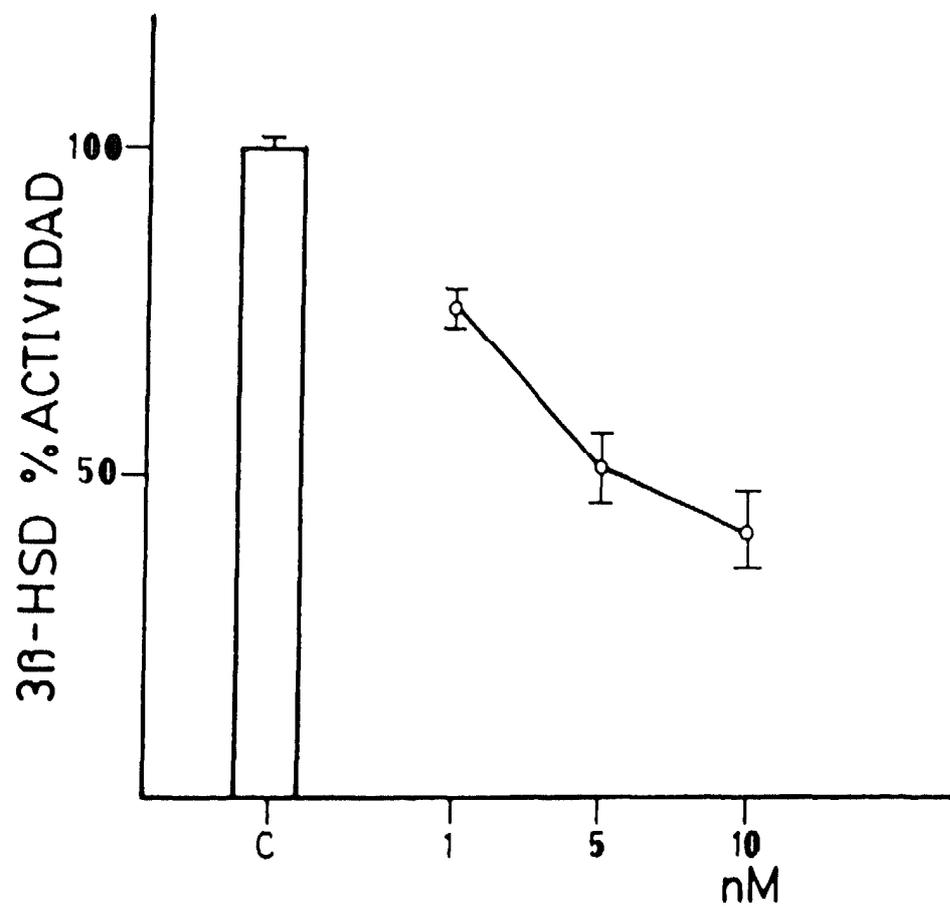


Figura 27.- Efecto de la cabeza polar del PI-G (1, 5 y 10 nM), añadida a cultivos de células granulosa ( $10^6$ /placa) durante 48 horas, sobre la actividad del enzima 3β-HSD, limitante en la síntesis de progesterona.

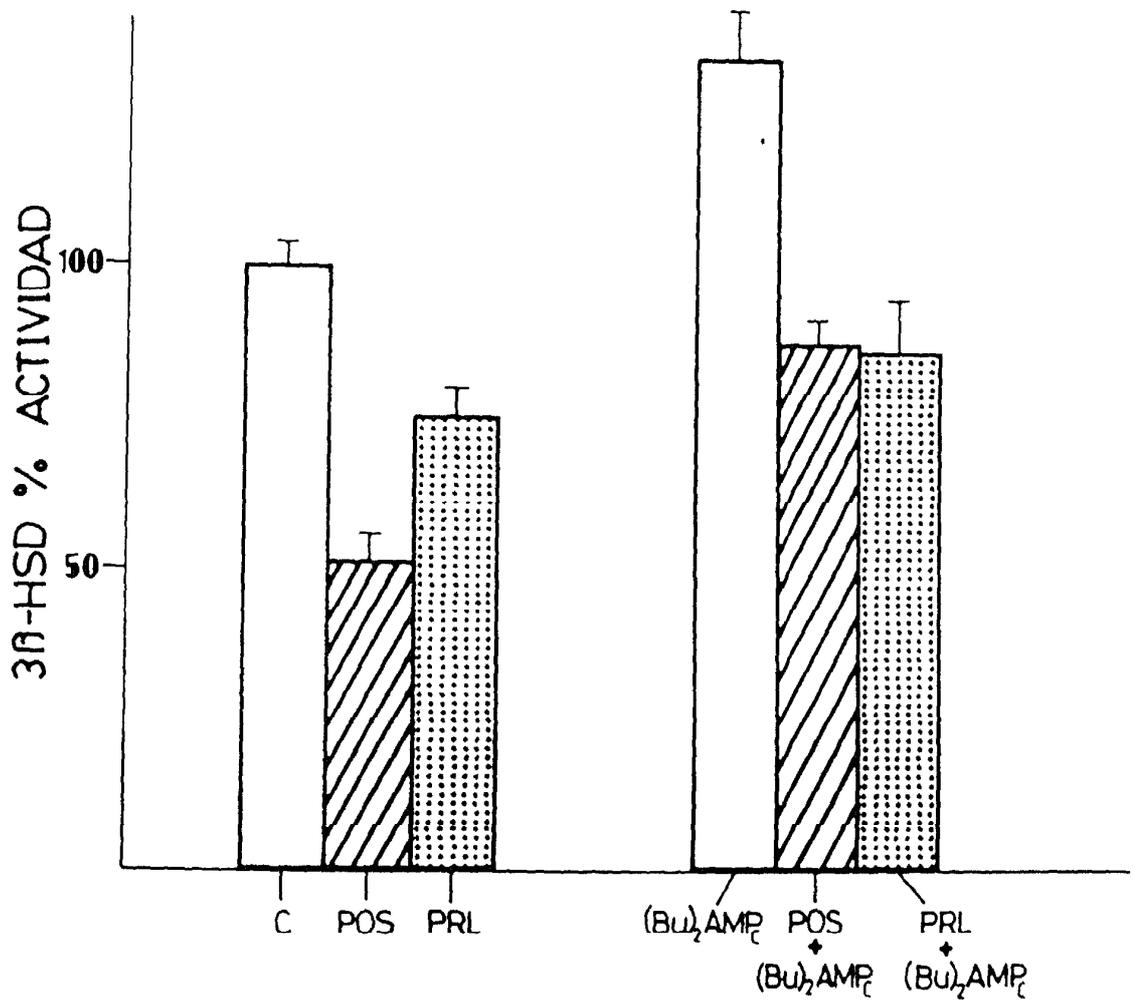


Figura 28.- Efecto del fosfoligosacárido (5 nM) obtenido de hígado de rata, y la prolactina (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sobre la actividad del enzima  $3\beta\text{-HSD}$ , basal e inducida con  $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$  (0.5  $\text{mg}/\text{ml}$ ).

5. DISCUSSION

En el presente trabajo, hemos aislado y caracterizado parcialmente, un fosfatidilinositol glicano (PI-G) de células granulosa indiferenciadas obtenidas por punción folicular de ovario de ratas hembra inmaduras.

En las membranas de las células eucariotas existe una gran variedad de fosfolípidos, de los cuales sólo unos pocos son necesarios para constituir la arquitectura de la bicapa lipídica de la membrana.

La permanencia en las membranas a lo largo de la evolución de otras formas minoritarias de fosfolípidos ha podido empezar a explicarse recientemente con la asignación a algunos de ellos de un papel, como precursores para la generación de mensajeros intracelulares (IP, DPI o TPI), como responsables de cambios en la fluidez de la membrana, que permitirían o facilitarían fenómenos tan diversos como la movilidad de receptores, los procesos secretores, la entrada de iones al citoplasma o como sistemas de anclaje de proteínas localizadas en la cara externa de las membranas (166,217). Como discutiremos más adelante, el PI-G identificado por nosotros en células granulosa, podría encontrarse entre los fosfolípidos de membrana no estructurales y que tendría, en cambio, una función en los procesos de señalización intracelular.

Los datos obtenidos en nuestro laboratorio, utilizando incorporación metabólica de azúcares y ácidos grasos saturados a la molécula del PI-glicano, sugieren que el lípido presente en las membranas de células granulosa, tiene una composición semejante al que puede aislarse de hepatocito (169,172,187,-188), linfocito (193), adipocito (191), células glomerulosa adrenocorticales (194) miocitos BC<sub>3</sub>H1 (170). La mitad polar de la molécula contiene, tal y como

se muestra en las Figs 5 a 7, mioinositol, glucosamina y galactosa. Los tres azúcares se encuentran incorporados a la molécula en una forma específica y no metabolizada, como lo muestra su recuperación, tras la hidrólisis con ácido clorhídrico del PI-glicano previamente marcado con los correspondientes isótopos. La excepción la constituye la glucosamina, un porcentaje importante de la cual es acetilada antes o después de su incorporación a la molécula del lípido.

Usando como control el contenido en glucosamina tras la incorporación con la molécula marcada, los porcentajes de incorporación de los azúcares a la molécula del PI-G, a las 24 horas, permiten aventurar la hipótesis de que la galactosa podría estar en la molécula en una proporción de 4:1 con respecto a la glucosamina y al inositol. Esta es una afirmación obviamente relativa, y no puede deducirse, en lo que respecta al mioinositol, de los datos presentados en este trabajo (Figs 5 y 7). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que para obtener una incorporación apreciable de [<sup>3</sup>H]mioinositol se hizo necesario utilizar un medio (el Ham F-10), en el que el azúcar se encuentra en muy pequeña proporción. Cuando las células se cultivan en McCoy's 5a, la incorporación de [<sup>3</sup>H]mioinositol es semejante a la obtenida con [<sup>3</sup>H]glucosamina.

El glicofosfolípido aislado por nosotros no contiene manosa, lo que permite diferenciarlo de otro gran grupo de fosfolípidos de membrana, los lípidos de anclaje de proteínas, presentes en las membranas de procariontes como el protozoo Trypanosoma brucei (216), en los cuales una proteína se encuentra asociada a la parte externa de la membrana, unida covalentemente la porción C-terminal del aminoácido con la etanolamina de una cadena glicosídica que contiene, además, manosa, galactosa, glucosamina e inositol (196).

Otras proteínas de superficie presentes en células eucariotas comparten la misma estructura de anclaje con la VSG del T. brucei. Entre ellas se encuentran enzimas hidrolíticos, proteínas pertenecientes al sistema activador del complemento, antígenos de superficie y otras de función desconocida (217).

El glicofosfolípido presente en la membrana de las células granulosa, tiene en común con el PI-G de anclaje de todas ellas, la composición de su cabeza polar, excepto en lo que respecta a la presencia de la manosa y probablemente de etanolamina.

En cuanto a la estructura de la cadena de azúcares que compone la cabeza polar de ambos tipos de glicofosfolípidos, tanto los de anclaje como aquellos presentes únicamente en células eucariontes y cuya hipotética función es la de precursores de mensajeros intracelulares, poseen una molécula de inositol unida al glicerol con fósforo por un enlace diéster (170,171,192,193). La glucosamina se encuentra unida con un enlace glicosídico al inositol (171,172) y tres o más moléculas de galactosa (171,197), probablemente unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -glicosídicos (191), forman la porción terminal de la cadena de los fosfolípidos descritos hasta el presente como asociados con el proceso de señalización intracelular.

Los fosfolípidos de anclaje tienen, como ya se ha referido, residuos manosa y una etanolamina terminal (196).

El glicofosfolípido aislado de células granulosa parece contener el mioinositol esterificado en el alcohol del carbono 3. La información acerca del lugar que ocupa el mioinositol en la cadena de oligosacárido, se obtuvo funda-

mentalmente de los resultados de someter el PI G a hidrólisis con PLC. Dichos resultados dependen en gran medida de la especificidad y potencia de la preparación de PLC usada. La preparación comercial utilizada por nosotros sólo libera el 50% del inositol de un fosfatidilinositol teóricamente puro, por lo que la hidrólisis corregida de aproximadamente el 50% del PI-glicano aislado de célula granulosa, sitúa a éste en lo que a sensibilidad a PLC se refiere, aproximadamente en la mitad del espectro formado por los glicofosfolípidos aislados de los diferentes tipos celulares.

Tal sensibilidad presenta grandes variaciones que incluyen desde el 100% de hidrólisis observada en el PI-G de anclaje de acetilcolinesterasa de eritrocitos bovinos y porcinos (217), el 50% en el PI-G de hepatocitos, hepatoma H35 o miocitos BC<sub>3</sub>H1 (171) o el 14% de sensibilidad a PLC, de un PI-G aislado de linfocitos (193).

En algunos casos, como el del PI-G de anclaje de la acetilcolinesterasa a la membrana de eritrocito humano, se ha especulado incluso, con la posibilidad de la existencia de una modificación en el anillo del inositol, consistente en la sustitución del alcohol en la posición 2, por un residuo esterificado de palmítico, lo cual dificultaría el reconocimiento por el centro activo de la PLC específica de PI (218).

Así pues, las variaciones en la resistencia del los distintos fosfatidilinositol glicanos a la hidrólisis con PLC, pueden ser explicadas, no sólo por diferencias en la potencia del enzima utilizado, sino por la existencia de pequeños cambios en la estructura de la molécula del lípido que lo hacen insensible a la PI-PLC, sin que ésto implique renunciar a la hipótesis de que la

forma de unión entre la cadena de oligosacáridos que conforman la cabeza polar y la mitad glicerol diacilo sea un enlace diéster entre el fósforo del mioinositol y el alcohol del carbono 3. Por tanto, el porcentaje de hidrólisis obtenido con el lípido aislado de célula granulosa, sugiere que es un fosfatidilinositol.

En el fosfatidilinositol glicano que constituye el anclaje a la membrana de la glicoproteína variante de superficie (VSG) del T. brucei (216) y en los PI-glicanos sensibles a insulina del hepatocito, adipocito, miocito BC<sub>3</sub>H1 y hepatoma H35 (170-172,191), la glucosamina se sitúa entre el mioinositol y la galactosa y demás componentes de la cabeza polar del lípido. La posición de la glucosamina y la existencia de un enlace glicosídico entre ésta y el mioinositol, puede demostrarse parcialmente, tras someter al lípido a la acción del ácido nitroso, que libera el terminal amino libre de la glucosamina, y rompe simultáneamente cualquier enlace glicosídico adyacente (216).

El PI-glicano aislado por nosotros de célula granulosa, sometido a tratamiento con ácido nitroso, se deamina en un porcentaje del 30 % del total. Existen diferencias en el grado de sensibilidad a la deaminación de los distintos PI-G aislados hasta el presente. Al igual que en el caso de la sensibilidad a PLC tales diferencias se mueven en un arco muy amplio que va desde la inactivación absoluta de la estructura que compone la cabeza polar tras la deaminación hasta pequeñas rupturas de tan sólo el 15%.

En la mayor parte de los casos, se atribuye la imposibilidad relativa del ácido nitroso para transformar en PI la molécula de PI-glicano, a la acetilación de la molécula de glucosamina de una proporción importante del lípido, lo

cual impediría la deaminación. A este respecto, y aunque parece dudoso que la molécula de glucosamina acetilada soporta sin romperse el tratamiento con HCl, quizás merece la pena resaltar que tras la hidrólisis ácida del PI-G marcado con [<sup>3</sup>H]glucosamina (Fig 9), una importante cantidad de la radioactividad (entre el 30 y el 40 % del total), emigra en TLC junto con el estándar de glucosamina acetilada. El rechazo, por insuficientemente concluyente, de esta última evidencia no implica, sin embargo, un rechazo paralelo de la posibilidad de que una parte de las moléculas del PI-glicano contengan glucosamina acetilada, y sea ésta la razón por la que no se obtiene un porcentaje de deaminación más alto.

Así pues, comparado el fosfatidilinositol glicano aislado de células granulosa, con los lípidos nativos de otros tejidos, y en lo que a la estructura de la cabeza polar se refiere, no parece haber grandes diferencias. Probablemente es un fosfatidilinositol, con un oligosacárido formado por glucosamina y dos o más moléculas de galactosa, unido al mioinositol a través de la glucosamina.

La porción glicerol diacilo de la molécula tampoco es diferente, a tenor de los datos obtenidos al tratar la molécula con fosfolipasa A<sub>2</sub>, de la descrita para otros PI-glicanos (170,172,193).

La presencia del fosfatidilinositol glicano en la membrana de la célula granulosa ovárica no tendría ninguna trascendencia, al menos en lo que a los mecanismos de señalización se refiere, si el contenido del lípido permanece inalterado en respuesta a los diferentes estímulos hormonales. En consecuencia hemos aplicado algunos de estos estímulos a células granulosa, y medido los cambios en el contenido de PI-G.

La hormona protagonista de la proliferación y diferenciación de la célula granulosa, la FSH, no produce ninguna variación rápida en el recambio del PI-G, en los diversos tiempos estudiados. Sin embargo, el tratamiento de los cultivos de granulosa con FSH o alguno de los agonistas del sistema AMPc, da lugar a un aumento en el contenido del PI-glicano marcado en la célula granulosa. Puesto que no se han realizado mediciones de masa total del lípido es difícil o casi imposible diferenciar si el aumento en el marcaje refleja un aumento en la masa total del lípido, y por tanto un estímulo de su síntesis por parte de la FSH, o si por el contrario se trata de un aumento de la incorporación del isótopo precursor. En el caso de la última hipótesis se hace asimismo difícil diferenciar entre la posibilidad de que la FSH esté simplemente aumentando la disponibilidad del/los azúcar/res precursor/es, aumentando su transporte o produciendo un aumento crónico en el recambio del lípido, que no sucede sin embargo de una forma aguda tal y como se ha descrito más arriba. Por otra parte, algunas evidencias indirectas, soportarían con más fuerza la hipótesis de que la FSH aumenta la síntesis del lípido y no su recambio.

En primer lugar, al menos en uno de los casos, se ha trabajado con células marcadas con [<sup>3</sup>H]galactosa en las cuales el lípido llega al equilibrio tras 24-48 horas de marcaje. En estas condiciones, cualquier aumento en la radioactividad asociada a la molécula refleja supuestamente un aumento en la cantidad total de ésta, es decir, un aumento de su síntesis.

En segundo lugar, los máximos incrementos en el marcaje del lípido, en respuesta a FSH o AMPc, se producen en el caso de los lípidos marcados con [<sup>3</sup>H]galactosa a las 48 horas, y no suceden cuando el isótopo utilizado es [<sup>3</sup>H]glucosamina hasta las 72 horas. Puesto que el ritmo de incorporación de la

glucosamina a la molécula de PI-glicano es mucho más lento, como lo es también la consecución del equilibrio cuando se utiliza este isótopo que cuando la galactosa es el precursor usado (Fig 5 y 6), si el efecto de la FSH consistiera en un aumento de la captación del azúcar y por tanto de su disponibilidad intracelular, sería previsible que las diferencias cronológicas observadas no existieran. Dado que dichas diferencias existen, lo que parecen sugerir es que la FSH aumenta la síntesis del lípido y que dicho incremento tarda más en reflejarse en el marcaje cuando el isótopo utilizado como precursor se incorpora más lentamente a la célula y se encuentra, por tanto, menos disponible y, por el contrario, se detecta antes cuando las células se encuentran marcadas con un isótopo que se incorpora y alcanza el equilibrio rápidamente.

Finalmente, el largo tiempo (48 h) necesario para que la FSH o sus análogos intracelulares, afecten el marcaje lípido es más sugerente de la existencia de un efecto sobre la síntesis que sobre el recambio. En todo caso, si este último efecto fuera el que reflejan las variaciones en el marcaje, y dada la inexistencia de una hidrólisis rápida del PI-G en respuesta a FSH, las diferencias en el recambio del lípido no serían probablemente debidas a la actuación de una PLC específica acoplada al receptor de FSH, sino a un efecto del AMPc generado en respuesta a la interacción FSH-receptor. Este último extremo no ha podido ser probado en células granulosa, ni existen tampoco antecedentes concluyentes en la literatura que lo prueben en otros tejidos, ni para un PI-glicano, ni para los fosfoinositósidos (166).

Si hay, por el contrario, evidencias de que otra hormona trófica, la ACTH, en otro tejido esteroideogénico, la corteza adrenal, genera aumentos en la síntesis de PI/DPI/TPI (166), sin producir su hidrólisis. Como el hipotéti-

co aumento en la síntesis del PI-glicano sucede alrededor de 48 h después del tratamiento con FSH, o agonistas del sistema AMPc, y coincide cronológicamente con la aparición de los cambios funcionales que determinan la diferenciación de la granulosa (aparición de la capacidad esteroideogénica, y expresión de receptores de membrana a otras gonadotropinas) (42), no es difícil imaginar una hipótesis sumamente atractiva. El aumento en la síntesis del PI-G pudiera ser uno más de los cambios funcionales que incluye la diferenciación, y su objetivo sería proveer a la membrana de una suficiente cantidad de sustrato que sería utilizado por otros agonistas hormonales (hCG, GnRH o PRL), cuyos receptores están siendo inducidos simultáneamente por la FSH (35,55).

Cambios similares en el marcaje de PI-glicano ocurren durante el proceso de activación de linfocitos con fitohemaglutinina, que supone el paso del estado de reposo o indiferenciado al activado o diferenciado (193). Si la hipótesis esbozada más arriba fuera cierta, alguna de las hormonas cuyos receptores son inducidos por FSH debería producir algún tipo de variación rápida en los niveles del lípido marcado previamente a equilibrio.

El fosfoligosacárido originado a partir de un PI-glicano extraído de hígado, tiene capacidad de inhibir "in situ" la actividad de la subunidad catalítica de la proteína quinasa A (193,206). El GnRH es un péptido cuyos receptores no son inducidos, pero sí mantenidos, por la FSH (57), y previene los efectos diferenciadores de la hormona actuando en algún punto (posiblemente PKA o alguno de sus sustratos) distal a la producción de AMPc. Los receptores para este péptido, que por otra parte se encuentran acoplados a una PLC que hidroliza fosfoinositósidos (179,180) eran los candidatos obvios para estar acoplados a una PLC que generaría en respuesta a la interacción del péptido

con su receptor. la cadena de fosfoligosacáridos del PI-G y por tanto variaciones en el recambio del lípido. Sorprendentemente, el GnRH (Fig 25) no fue capaz de inducir, a ninguno de los tiempos estudiados, cambios en la cantidad de lípido marcado previamente a equilibrio. El EGF, otro péptido cuyos efectos sobre la diferenciación FSH-inducida son similares a los del GnRH (126), tampoco produjo el más mínimo cambio en el marcaje del PI-glicano (Fig 24). Se obtuvo por el contrario, una discreta (30%) y ligeramente lenta (5 minutos) desaparición, quizás como consecuencia de la hidrólisis del lípido, en respuesta a otro factor de crecimiento, el IGF-I (Fig 22) y a la insulina (Fig 21). Este efecto, si bien modesto, confirmaría la ubicuidad del PI-G como generador del mensajero intracelular de la insulina, tal y como ha sido descrito (702,189,193).

En cuanto al papel específico del fosfatidilinositol glicano en la señalización intracelular en célula granulosa, éste debe estar casi con seguridad asociado a la transmisión intracelular de la señal de otras dos hormonas: la hCG/LH y la Prolactina.

La hCG/LH (Fig 23) produce una mínima (18%) y rápida (60 seg) hidrólisis del PI-G en células indiferenciadas y, por consiguiente, prácticamente carentes de receptores a la hormona. Sin embargo, inducidos dichos receptores con FSH durante 48 horas, se obtiene además del aumento en la cantidad del PI-G ya discutido, una pronunciada (50%) y rápida (60 seg) hidrólisis del lípido en respuesta a dosis fisiológicas de hCG, que desaparece también muy rápidamente, para recuperar los niveles basales.

Un resultado similar se obtiene al utilizar PRL (Fig 26) en células indiferenciadas, y tras la inducción de receptores a la hormona. Sin embargo, el

tipo de cambio generado en el fosfolípido, marcado a equilibrio, por la PRL es diferente del originado por la hCG. Después de una pequeña y rápida hidrólisis, se produce un aparente e igualmente rápido aumento en la síntesis, por encima de los niveles basales, cuyo significado desconocemos todavía, y deberá ser objeto de estudio en el futuro. No es éste, sin embargo, el hecho que más llama la atención ni el más difícilmente explicable, cuando se comparan los efectos de ambas hormonas sobre el recambio del PI-G.

La hCG es una hormona cuyo receptor en célula granulosa se encuentra acoplado a adenilil ciclasa (131,132) y también posiblemente a una PLC generadora de DAG e  $IP_3$  (165). No existen evidencias concluyentes acerca de cuáles de los efectos biológicos de la hCG en célula granulosa ovárica se encuentran mediados por cada uno de los dos sistemas de mensajeros, pero lo que es evidente y ampliamente conocido, es que ninguno de esos efectos tiene el carácter inhibitorio que cabría suponer si un PI-G idéntico al aislado de hepatocito fuera el sustrato en célula granulosa de la hidrólisis inducida por hCG.

En lo que a la PRL se refiere, sus efectos biológicos en célula granulosa, están suficientemente definidos, y la naturaleza de su(s) mediador(es) intracelular(es) en esta célula es desconocida. Hemos utilizado cabeza polar generada a partir de lípido extraído de hígado (188,189), al cual la membrana celular es permeable (188,189,202,207-209), para medir sus efectos sobre la síntesis de progesterona en células indiferenciadas y diferenciadas, midiendo asimismo en paralelo los efectos de la PRL, en un intento de desvelar, aunque parcialmente, tanto los efectos biológicos de la PRL como la naturaleza de su mediador. En la Fig 27 se muestra que dosis crecientes de POS extraído de hepatocitos inducen una disminución de hasta el 50% de la actividad del enzima

limitante de la síntesis de progesterona, la  $3\beta$ -HSD. Una dosis suficiente de dicha cabeza polar es capaz asimismo de prevenir la inducción del enzima por FSH o AMPc (Fig 28). El efecto es idéntico al obtenido con PRL, si bien en células indiferenciadas, la ausencia de receptores a la hormona, hace que la disminución de la actividad del enzima sea poco apreciable.

Con estos datos no parece aventurado afirmar que el PI-G aislado de célula granulosa es seguramente idéntico al aislado de hígado, y que tras ser aumentado su contenido en la membrana de células granulosa por la FSH, e inducidos por ésta los receptores de PRL, la PRL al unirse a su receptor induce la generación a partir del PI-G de un mensajero intracelular, que media su efecto sobre la síntesis de progesterona en la célula diferenciada. Sin embargo, esta legítima conclusión, tiene un reverso inquietante y contradictorio cuando se comparan efectos biológicos y efectos sobre el recambio del PI-G de la PRL y la hCG, tal y como ya se ha sugerido antes.

Si la PRL genera POS a partir del lípido, y el oligosacárido tiene un efecto inhibitorio sobre la síntesis de progesterona, como la hCG/LH, cuyo efecto sobre dicha síntesis es franca y definitivamente estimulante (el rasgo funcional más relevante de la luteinización es la gran producción de progesterona que tiene lugar durante el proceso), también induce la hidrólisis del PI-G y supuestamente la liberación de su cabeza polar.

En otros tejidos de los que se han aislado PI-glicanos, ha sido posible identificar más de una forma de estos fosfolípidos (170,171,190), diferenciables entre sí por su resistencia al tratamiento con PLC, a la deaminación o incluso por el carácter acilo o alquilo de la unión entre el ácido graso del

carbano 2 y el glicerol. Hasta el momento, no tenemos más que vagos indicios de la existencia de más de un PI-G en la membrana de la célula granulosa. Tales indicios consisten en la detección de dos picos claramente diferenciados de PI-G que aparecen sólo cuando el lípido ha sido marcado con los ácidos grasos, y no cuando se marca con alguno de los azúcares. Si en el futuro la profundización de los estudios ya comenzados en nuestro laboratorio, acerca de la posible existencia de más de un PI-G en la célula granulosa tuvieran éxito, y tales PI-G fueran aislados, y definidas sus diferencias estructurales, ésta podría ser la explicación a la paradoja, quizá sólo aparente, con la que nos enfrentamos en este momento.

Si así fuera, habremos caracterizado el tercer mensajero intracelular para la LH/hCG en célula granulosa. Mientras tanto, creemos que no es aventurado ni imprudente afirmar que la cabeza polar del PI-G aislado de célula granulosa, y similar al de hepatocito, es el primer mediador intracelular de la PRL en célula granulosa ovárica descrito hasta el momento.

## 6. CONCLUSIONES

1.- El cultivo primario de células granulosa, obtenidas de ratas inmaduras tratadas con DES está formado por células en un estado homogéneo de indiferenciación. Tratadas con FSH, alguno de los generadores de AMPc o sus análogos sintéticos, presentan características morfofuncionales de diferenciación.

2.- De las células granulosa indiferenciadas se ha aislado, purificado y caracterizado, un fosfatidilinositol glicano, análogo a otros descritos en la literatura.

3.- El esqueleto de dicho PI-glicano está formado por glicerol con dos ácidos grasos saturados, palmítico y mirístico, esterificados con el alcohol de los carbonos 1 y 2. El palmitato se incorpora a la molécula en una proporción 6:1 con respecto al miristato.

4.- El alcohol del carbono 3 se encuentra unido por un enlace diéster, a través de fósforo, con una cadena de oligosacáridos.

5.- La cadena de oligosacáridos nombrada contiene mioinositol, glucosamina y galactosa, esta última en proporción 4:1 respecto al mioinositol y la glucosamina.

6.- Una porción importante de la glucosamina que compone la cabeza polar, se encuentra posiblemente acetilada, lo que explica la relativa resistencia a la hidrólisis con ácido nítrico.

7.- La hormona folículo estimulante (FSH) o su mensajero intracelular, el AMPc, aumentan el contenido en el lípido asociado a la membrana, probablemente como una más de sus acciones diferenciadoras en estas células.

8.- El PI-glicano es hidrolizado en una pequeña proporción (alrededor del 30%) por la insulina y el IGF-I, al igual que ocurre en otros tejidos.

9.- Hasta un 50% del glicofosfolípido sufre hidrólisis en respuesta a la hCG/LH lo que permite suponer que alguno de los productos de dicha hidrólisis es uno de los mensajeros de la hCG/LH en célula granulosa ovárica.

10.- La Prolactina induce una rápida hidrólisis seguida de un aumento no menos rápido de la síntesis del glicofosfolípido. Este es el primer cambio descrito de un putativo segundo mensajero en respuesta a la prolactina en alguno de sus tejidos diana.

11.- El fosfooligosacárido obtenido de hígado por hidrólisis con PLC, reproduce alguno de los efectos biológicos de la PRL en célula granulosa ovárica.

12.- Ningún otro de los agonistas hormonales estudiados con efectos sobre la diferenciación de la célula granulosa ovárica, produce cambios en el contenido o recambio del fosfatidilinositol glicano estudiado.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- BJERSING L., CARSTENSEN H.: The role of the granulosa cell in the biosynthesis of ovarian steroid hormones. *Biochem Biophys Acta.* 86, 639-640, 1964.
- 2.- ERICKSON G.F., HSUEH A.J.W.: Stimulation of aromatase activity by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 102, 1275-1282, 1978.
- 3.- AMSTERDAM A., ROTMENSCH S.: Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocr Rev.* 8, 309-337, 1987.
- 4.- ERICKSON G.F.: Normal ovarian function. *Clin Obst Gynecol.* 21, 31-52, 1978.
- 5.- LAWRENCE T.S., BEERS W.H., GILULA N.B.: Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature.* 272, 501-506, 1978.
- 6.- AMSTERDAM A., ROTMENSCH S., BEN-ZE'EV, A.: Coordinated regulation of morphological and biochemical differentiation in a steroidogenic cell: The granulosa cell model. *TIBS.* 14, 377-382, 1989.
- 7.- NIMROD A., ERICKSON G.F., RYAN K.J.: A specific FSH receptor in rat granulosa cells: Properties of binding in vitro. *Endocrinology.* 98, 56-64, 1976.
- 8.- SMITH WHITE S., OJEDA S.R.: Changes in ovarian luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the female rat. *Endocrinology.* 109, 152-161, 1981.
- 9.- JONES P.B.C., CONN P.M., MARIAN J., HSUEH A.J.W.: Binding of gonadotropin releasing hormone agonist to rat ovarian granulosa cells. *Life Sci.* 27, 2125-2132, 1980.
- 10.- HAZUM E., NIMROD A.: Photoaffinity-labeling and fluorescence-distribution studies of gonadotropin-releasing hormone receptors in ovarian. *Biochemistry.* 79, 1747-1750, 1982.
- 11.- TONETTA S., DIZEREGA G.S.: Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr Rev.* 10, 205-229, 1989.
- 12.- ADASHI E.Y., RESNICK C.E., D'ERCOLE A.J., SVOBODA M.E., VAN WYK J.J.: Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev.* 6, 400-420, 1985.
- 13.- JONES P.B.C., WELSH T.H. Jr., HSUEH A.J.W.: Regulation of ovarian progesterin production by EGF in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem.* 257, 11268-11273, 1982.
- 14.- FENG P., KNECHT M., CATT K.: Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during granulosa cell differentiation. *Endocrinology.* 120, 1121-1126, 1987.
- 15.- BENDELL J.J., DORRINGTON J.: Rat thecal/interstitial cells secrete a transforming growth factor- $\beta$ -like factor that promotes growth and differentiation in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 123, 941-948, 1988.

- 16.- MAY J.V., SCHOMBERG D.W.: Granulosa cell differentiation in vitro: Effect of insulin on growth and functional integrity. *Biol Reprod.* 25, 421-431, 1981.
- 17.- FUKUOKA M., YASUDA K., TAI S., TAKAKURA K., TAKAHIDE M.: Interleukin-1 stimulates growth and inhibits progesterone secretion in cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology.* 124, 884-890, 1989.
- 18.- CHRISTIE M.H., GWYNNE J.T., STRAUSS J.F. III: Binding of human high density lipoproteins to membranes of luteinized rat ovaries. *J Steroid Biochem.* 14, 671-678, 1982.
- 19.- HSUEH A.J.W., ADASHI E.Y., JONES P.B.C., WELSH T.H. Jr.: Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev.* 5, 76-127, 1984.
- 20.- AGUADO L.I., PETROVIC S.L., OJEDA S.R.: Ovarian  $\beta$ -adrenergic receptors during the onset of puberty: Characterization, distribution and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology.* 110, 1124-1132, 1982.
- 21.- SCHAEFFER J.M., HSUEH A.J.W.: Identification of gamma-aminobutyric acid and its binding sites in the ovary. *Life Sci.* 30, 1599-1604, 1982.
- 22.- POLAN M.L., DECHERNEY A.H., HASELTINE F.P., MEZER H.C., BEHRMAN H.R.: Adenosine amplifies follicle-stimulating hormone action in granulosa cells and luteinizing hormone action in luteal cells of rat and human ovaries. *J Clin Endocrinol Metabol.* 56, 288-294, 1983
- 23.- RICHARDS J.S.: Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development: Modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology.* 97, 1174-1184, 1975.
- 24.- RICHARDS J.S., MIDGLEY A.R. Jr.: Protein hormone action: A key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol Reprod.* 14, 82-94, 1976
- 25.- SCHREIBER J.R., NAKAMURA K., ERICKSON G.F.: Progestins inhibit FSH-stimulated steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 19, 165-173, 1980.
- 26.- SCHREIBER J.R., ROSS G.T.: Further characterization of a rat ovarian testosterone receptor with evidence for nuclear translocation. *Endocrinology.* 99, 590-596, 1976.
- 27.- SCHREIBER J.R., NAKAMURA K., ERICKSON G.F.: Rat ovary glucocorticoid receptor : Identification and characterization. *Steroids.* 39, 569-584, 1982.
- 28.- MOTTA P.M., van BLERKOM J.: Structure and ultrastructure of ovarian follicles. En: *Human Ovulation.* E.S.E. Hafez (Ed). Elsevier, North Holland Biomedical Press. 17-38, 1979.
- 29.- McNATTY K.P., HUNTER W.N., McNEILLY A.S., SAWERS R.S.: Changes in the concentration of pituitary and steroid hormones in the follicular fluid of human graafian follicles throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol.* 64, 555-571, 1975.

- 30.- VAN DE WIEL D.F.M., BAR-AMI S., TSAFRIRI A., DE JONG F.H.: Oocyte maturation inhibitor, inhibin and steroid concentrations in porcine follicular fluid at various stages of the oestrous cycle. *J Reprod Fert.* 68, 247-252, 1983.
- 31.- ARMSTRONG D.T., PAPKOFF H.: Stimulation of aromatization of endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rat in vivo by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 99, 1144-1151, 1976.
- 32.- ZELEZNIK A.J., MIGDLEY A.R. Jr., REICHERT L.E. Jr.: Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology.* 95, 818-825, 1974
- 33.- RICHARDS J.S., IRELAND J.T., RAO M.C., BERNATH G.A., MIGDLEY A.R., REICHERT L.E. Jr.: Ovarian follicular development in the rat: Hormone receptor regulation by estradiol, follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology.* 99, 1562-1570, 1976.
- 34.- RICHARDS J.S., WILLIAMS J.J.: Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH): Regulation by LH and PRL. *Endocrinology.* 99, 1571-1581, 1976.
- 35.- WANG C., HSUEH A.J.W., ERICKSON G.F.: Induction of functional prolactin receptors by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 254, 11330-11336, 1979
- 36.- McNATTY K.P., HENDERSON K.M., SAWERS R.S.: Effects of prostaglandins  $F_{2\alpha}$  and  $E_2$  on the production of progesterone by human granulosa cells in tissue culture. *J Endocrinol.* 67, 231-240, 1975.
- 37.- JONES P.B.C., HSUEH A.J.W.: Regulation of progesterone metabolizing enzyme by adrenergic agents, prolactin and prostaglandins in cultured rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 109, 1347-1354, 1981.
- 38.- CHABOT J.-G., St-ARNAUD R., WALKER P., PELLETIER G.: Distribution of epidermal growth factor receptors in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol.* 44, 99-108, 1986.
- 39.- HASHIMOTO I., ASANI T., WIEST W.G.: Progestational function of perfused rat corpora lutea. *Endocrinology.* 96, 421-430, 1975.
- 40.- LEE C.Y., TAKAHASHI: Follicle-stimulating hormone receptors in rat ovaries: Decrease in numbers of bindings states associated with luteinization. *Endocrinology.* 101, 869-875, 1977.
- 41.- PIEPER D.R., RICHARDS J.S., MARSHALL J.C.: Ovarian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors: Characterization, distribution, and induction by GnRH. *Endocrinology.* 108, 1148-1155, 1981.
- 42.- ERICKSON G.F.: Primary cultures of ovarian cells in serum-free medium as models of hormone-dependent differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 29, 21-49, 1983.
- 43.- AMSTERDAM A., KENCHT M., CATT K.J.: Hormonal regulation of cytodifferen-

- tiation and intercellular communication in cultured granulosa cells. Proc Nat Acad Sci USA. 78, 3000-3004, 1981.
- 44.- CARNEGIE J.A., DARDICK I., TSANG B.K.: Microtubules and the gonadotropic regulation of granulosa cell steroidogenesis. Endocrinology. 120, 819-828, 1987.
- 45.- HSUEH A.J.W., JONES P.B.C., ADASHI E.Y., WANG C., ZHUANG L.-Z., WELSH T. H.Jr.: Intraovarian mechanisms in the hormonal control of granulosa cell differentiation in rats. J Reprod Fert. 69, 325-342, 1983.
- 46.- DORRINGTON J.H., ARMSTRONG D.T.: Effects of FSH on gonadal functions. Recent Prog Hormone Res. 35, 301-333, 1979.
- 47.- ADASHI E.Y., HSUEH A.S.W.: Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. J Biol Chem. 257, 6077-6083, 1982.
- 48.- GOLDENBERG R.L., VAITUKAITIS J.L., ROSS G.T.: Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rat. Endocrinology. 90, 1492-1498, 1972.
- 49.- McNATTY K.P., MAKRIS A., DE GRAZIE C., OSATHANONDH R., RYAN K.J.: The production of progesterone, androgens and estrogens by granulosa cells, thecal tissue and stromal tissue from human ovaries in vitro. J Clin Endocrinol Metab. 49, 687-699, 1979.
- 50.- JONES P.B.C., HSUEH A.J.W.: Regulation of ovarian  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity by gonadotropin-releasing hormone and follicle-stimulating hormone in culture rat granulosa cells. Endocrinology. 110, 1663-1671, 1982.
- 51.- McMASTERS K.M., DICKSON L.A., SHAMY R.V., ROBISCHON K., MACDONALD G.F., MOYLE W.R.: Rat cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450<sub>scc</sub>): Use of a cDNA probe to study the hormonal regulation of P-450<sub>scc</sub> mRNA levels in ovarian granulosa cells. Gene. 57, 1-9, 1987.
- 52.- TOAFF M.E., STRAUSS J.F. III, HAMMOND J.M.: Regulation of cytochrome P-450<sub>scc</sub> in immature porcine granulosa cells by FSH and stradiol. Endocrinology. 112, 1156-1158.
- 53.- MOON Y.S., DULEBA A.J., KIM K.S., HO YUEN B.: Alterations of  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in cultured rat granulosa cells by follicle-stimulating hormone and testosterone. Biol Reprod. 32, 998-1009, 1985.
- 54.- VIDYASHANKAR N., MOUGDAL N.R.: Effect of pregnant mare serum gonadotropin on the induction and degradation of FSH and LH receptor in the granulosa cell of the immature rat. Mol Cell Endocrinol. 37, 215-222, 1984.
- 55.- ERICKSON G.F., WANG C., HSUEH A.J.W.: FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium. Nature. 279, 336-338. 1979.
- 56.- St-ARNAUD R., WALKER P., KELLY P.A., LABRIE F.: Rat ovarian epidermal growth factor receptors: Characterization and hormonal regulation. Mol Cell Endocrinol. 31, 43-52, 1983.

- 57.- RANTA T., KNECHT M., KODY M., CATT K.J.: GnRH receptors in cultured rat granulosa cells: mediation of the inhibitory and stimulatory actions of GnRH. *Mol Cell Endocrinol.* 27, 233-240, 1982.
- 58.- BILLIG H., HEDIN L., MAGNUSSON C.: Gonadotropins stimulate lactate production by cumulus and granulosa cells. *Acta Endocrinol.* 103, 562-566, 1983.
- 59.- ZHANG Z., LEE V.W.K., CARSON R.S., BURGER H.G.: Selective control of rat granulosa cell inhibin production by FSH and LH in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 56, 35-40, 1988.
- 60.- FRANCHIMONT P., HAZEE-HAGELSTEIN M-T., JASPAR J-M., CHARLET-RENARD C., DEMOULIN A.: Inhibin and related peptides: Mechanisms of action and regulation of secretion. *J Steroid Biochem.* 32, 193-197, 1989.
- 61.- SHAW K.J., CAMPEAU J.D., ROCHE P.C., DiZEREGA G.S.: Porcine granulosa cell production of plasminogen activator: Disparity between the effects of hCG and FSH. *Clin Exp Endocrinol.* 3, 26-34, 1985.
- 62.- REICH R., MISKIN R., TSAFRIRI A.: Follicular plasminogen activator: Involvement in ovulation. *Endocrinology.* 116, 516-521, 1985.
- 63.- RANI C.S.S., SALHANICK A.R., ARMSTRONG D. T.: Follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells: An examination of the need for steroids in the induction process. *Endocrinology*, 108, 1379-1385, 1981.
- 64.- BEN-ZE'EV A., KOHEN F., AMSTERDAM.: Gonadotropin-induced differentiation of granulosa cells is associated with the coordinated regulation of cytoskeletal proteins involved in cell-contact formation. *Differentiation.* 34, 222-235, 1987.
- 65.- LARSEN W.J., TUNG H.N., POLKING C.: Response of granulosa cell gap junctions to human chorionic gonadotropin (hCG) at ovulation. *Biol Reprod.* 25, 1119-1134, 1981.
- 66.- BJERSING L., CAJANDER S.: Ovulation and the mechanism of follicle rupture IV. Ultrastructure of membrane granulosa of rabbit graafian follicles prior to induced ovulation. *Cell Tissue Res.* 153, 1-14, 1974.
- 67.- CLARK M.R., MARSH J.M., LE MARIE W.: Mechanism of luteinizing hormone regulation of prostaglandin synthesis in rat granulosa cells. *J Biol Chem.* 253, 7757-7761, 1978.
- 68.- TSAFRIRI A., CHANNING C.P.: Inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. *Endocrinology.* 96, 922-927, 1975.
- 69.- GOLDENBERG R.L., REITER E.O., VAITUKAITIS J.L., ROSS G.-T.: Interaction of FSH and hCG on follicle development in the ovarian augmentation reaction. *Endocrinology.* 91, 533-536, 1972.
- 70.- SCHULER L.A., TOAFF M.E., STRAUSS III J.F.: Regulation of ovarian cholesterol metabolism: Control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase

- and acyl coenzyme A:Cholesterol acyltransferase. *Endocrinology*. 108, 1476-1486, 1981.
- 71.- BEHRMAN H.R., ARMSTRONG D.T.: Cholesterol esterase stimulation by luteinizing hormone in luteinized rat ovaries. *Endocrinology*. 85, 474-480, 1969.
- 72.- RODGERS R.J., WATERMAN M.R., SIMPSON: Cytochromes P-450<sub>scd</sub>, P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  adrenodoxin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase in bovine follicles and corpora lutea. Changes in specific contents during ovarian cycle. *Endocrinology*. 118, 1366-1374, 1986.
- 73.- RUBIN B.L., DEANE V.W., HAMILTON V.A., DRIKS E.C.: Changes in  $\Delta^5$ - $3\beta$ -HSD activity in the ovaries of maturing rats. *Endocrinology*. 72, 924-930, 1963.
- 74.- MADEJ E.: Effect of exogenous hormones on the activity of  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in cultured granulosa cells from proestrous and preovulatory rat ovarian follicles. *Acta Histochem*. 67, 253-260, 1980.
- 75.- BOGOVICH K., RICHARDS J.S.: Androgen biosynthesis in developing ovarian follicles: Evidence that luteinizing hormone regulates thecal  $17\alpha$ -hydroxylase C<sub>17-20</sub>-lyase activities. *Endocrinology*. 111, 1201-1208.
- 76.- ARMSTRONG D.T., DORRINGTON J.H.: Androgens augment FSH-induced progesterone secretion by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 99, 1411-1414, 1976.
- 77.- SOODAK L.K., BEHRMAN H.R.: Mitochondria mediate amplification of luteinizing hormone action by adenosine in luteal cells. *Endocrinology*. 122, 1308-1313, 1988.
- 78.- LOEXEN M.R., CHANNING C.P., DÉLETTO R., WEISS G.: Stimulatory effect of luteinizing hormone upon relaxin secretion by cultured porcine preovulatory granulosa cells. *Endocrinology*. 112, 769-783, 1983.
- 79.- TSAFRIRI A., CHANNING C.P., POMERANTZ S.H., LINDNER H.R.: Inhibition of maturation of isolated rat oocytes by porcine follicular fluid. *J Endocrinol*. 75, 285-291, 1977.
- 80.- EINSPANIER R., PITZEL L., WUTTKE W., HAGENDORFF G., PREUB K.-D., KARDALINO E. Y SCHEIT K.H.: Demonstration of mRNAs for oxytocin and prolactin in porcine granulosa and luteal cells. *FEBS letters*. 204, 37-40, 1986.
- 81.- VELDHUIS J.D., KLASE P., HAMMOND J.M.: Divergent effects of prolactin upon steroidogenesis by porcine granulosa cells in vitro: Influence of cytodifferentiation. *Endocrinology*. 107, 42-46, 1980.
- 82.- WANG C., CHAN V.: Divergent effects of prolactin on estrogen and progesterone production by granulosa cells of rat graafian follicles. *Endocrinology*. 110, 1085-1093, 1982.
- 83.- FORTUNE J.E., VINCENT S.E.: Prolactin modulates steroidogenesis by rat granulosa cells: I. Effects on progesterone. *Biol Reprod*. 35, 84-91, 1986.
- 84.- JONES P.B.C., VALK C.A., HSUEH A.J.W.: Regulation of progestin biosynthe-

tic enzymes in cultured rat granulosa cells: Effects of prolactin,  $\beta_2$ -adrenergic agonist, human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod.* 29, 572-585, 1983.

85.- WANG C., HSUEH A.J.W., ERICKSON G.F.: Prolactin inhibition of estrogen production by cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 20, 135-144, 1980.

86.- CASPER R.F., ERICKSON G.F.: In vitro heteroregulation of LH receptors by prolactin and FSH in rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 23, 161-171, 1981.

87.- JONES P.B.C., HSUEH A.J.W.: Direct effects of gonadotropin-releasing hormone and its antagonist upon ovarian functions stimulated by FSH, prolactin and LH. *Biol Reprod.* 24, 747-759, 1981.

88.- STRAUSS D.: Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo. *Endocr Rev.* 5, 356-369, 1984.

89.- DORRINGTON J.H., BENDELL J.J., CHUMA A., LOBB D.K.: Actions of growth factors in the follicle. *J Steroid Biochem.* 27, 405-411, 1987.

90.- VELDHUIS J.D., NESTLER J.E., STRAUSS J.F. III, GLUYNNE J.T.: Insulin regulates low density lipoprotein metabolism by swine granulosa cells. *Endocrinology.* 118, 2242-2253, 1986.

91.- VELDHUIS J.D., KOLP L.A., TOAFF M.E., STRAUSS J.F. III, DEMERS L.: Mechanisms subserving the trofic actions of insulin on ovarian cells. *J Clin Invest* 72, 1046-1057, 1983.

92.- SKINNER M.K., MCKERACHER H.L., DORRINGTON J.H.: Fibronectin as a marker of granulosa cell cytodifferentiation. *Endocrinology.* 117, 886-892, 1985.

93.- DAVOREN J.B., HSUEH A.J.W.: Insulin enhances FSH-stimulated steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 35, 97-105, 1984.

94.- GARZO V.G., DORRINGTON J.H.: Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle-stimulating hormone and insulin. *Am J Obstet Gynec.* 148, 657-662, 1984.

95.- MAY J.V., McCARTY K. Jr., REICHERT L.E., SCHOMBERG D.W.: Follicle-stimulating hormone-mediated induction of functional luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors during monolayer culture of porcine granulosa cells. *Endocrinology.* 107, 1041-1049, 1980.

96.- ADASHI E.Y., RESNICK C.E., HERNANDEZ E.R., SVOBODA M.E., VAN WYK J.J.: Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/insulin-like growth factor I in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 122, 194-201, 1988.

97.- SCHAMS D., KOLL R., LI CH.: Insulin-like growth factor-I stimulates oxytocin and progesterone production by bovine granulosa cells in culture. *J Endocrinol.* 116, 97-83, 1987.

98.- ADASHI E.Y., RESNICK C.E., BRODIE A.M.H., SVOBODA M.E., VAN WYK J.J.:

Somatomedin-C mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 117, 2313-2320, 1985.

99.- VELDHIJIS J.D., ROGERS R.J., FURNALETTO R.W.: Synergistic action of estradiol and the insulin-like growth factor, somatomedin-C, on swine ovarian (granulosa) cells. *Endocrinology*. 119, 530-538, 1986.

100.- ADASHI E.Y., RESNICK C.E., HERNANDEZ E.R., SVOBODA M.E., VAN WIK J.J.: In vivo regulation of granulosa cell somatomedin-C/Insulin-like growth factor I receptors. *Endocrinology*. 122, 1383-1389, 1988.

101.- ADASHI E.Y., RESNICK C.E., SVOBODA M.E., VAN WYK J.J., HASCALL V.C., YANAGISHITA M.: Independent and synergistic actions of somatomedin-C in the stimulation of proteoglycan biosynthesis by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 118, 456-458, 1986.

102.- ZHIWEN Z., CARSON R.S., HERINGTON A.C., LEE V.W.K., BURGER H.G.: Follicle-stimulating hormone and somatomedin-C stimulate inhibin production by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology*. 120, 1633-1638, 1987.

103.- ADASHI E.Y., RESNICK C.E., SVOBODA M.E., VAN WYK J.J.: Somatomedin-C enhances induction of luteinizing hormone receptors by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 116, 2369-2375, 1985.

104.- OLIVER J.E., AITMAN T.J., POWELL J.F., WILSON C.A., CLAYTON R.N.: Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology*. 124, 2671-2679, 1989.

105.- HSU C-J., HAMMOND J.M.: Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology*. 120, 198-207, 1987.

106.- MONDSCHHEIN J.S., HAMMOND J.M.: Growth factors regulate immunoreactive insulin-like growth factor I production by cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*. 123, 463-468, 1988.

107.- HERNANDEZ E.R., ROBERTS C.T., LEROITH D., ADASHI E.Y.: Rat ovarian insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression is granulosa cell-selective: 5'-untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation. *Endocrinology*. 125, 572-574, 1989.

108.- BLAIR E.I., KIM I-CH., ESTES J.E., KESKI-OJA J., SCHOMBERG D.W.: Human platelet-derived growth factor preparations contain a separate activity which potentiates follicle-stimulating hormone receptor-mediated induction of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells: Evidence for transforming growth factor- $\beta$ . *Endocrinology*. 123, 2003-2008, 1988.

109.- BENDELL J.J., DORRINGTON J.: Rat thecal/interstitial cells secrete a transforming growth factor- $\beta$ -like factor that promotes growth and differentiation in rat granulosa cells. *Endocrinology*. 123, 941-948.

110.- MONDSCHHEIN J.S., SCHOMBERG D.W.: Growth factors modulate gonadotropin receptor induction in granulosa cell cultures. *Science*. 211, 1179-1181, 1981.

- 111.- KNECHT M., FENG P., CATT K.: Bifunctional role of transforming growth factor- $\beta$  during granulosa cell development. *Endocrinology*. 120, 1243-1249, 1987.
- 112.- MONSCHEIN J.S., CANNING S.F., HAMMOND J.M.: Effects of transforming growth factor- $\beta$  on the production of immunoreactive insulin-like growth factor I and progesterone and on [ $^3$ H]thymidine incorporation in porcine granulosa cell cultures. *Endocrinology*. 123, 1970-1976, 1988.
- 113.- HSUEH A.J.W., JONES P.B.C.: Extrahypothalamic actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev.* 2, 437-461, 1981.
- 114.- YING S.-Y., LING N., BOHLEN P., GUILLEMIN R.: Gonadotropins: Peptides in ovarian follicular fluid stimulating the secretion of pituitary gonadotropins. *Endocrinology*. 108, 1206-1215, 1981.
- 115.- HSUEH A.J.W., WANG C., ERICKSON G.F.: Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptors and aromatase activity in rat granulosa cells. *Endocrinology*. 106, 1697-1705, 1980.
- 116.- JONES P.B.C., HSUEH A.J.W.: Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon luteal luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in hypophysectomized rats. *Endocrinology*. 107, 1930-1936, 1980.
- 117.- JONES P.B.C., HSUEH A.J.W.: Direct stimulation of ovarian progesterone-metabolizing enzyme by gonadotropin-releasing hormone in cultured granulosa cells. *J Biol Chem* 256, 1248-1254, 1981.
- 118.- BIRNBAUMER L., SHAHABI N., RIVIER J., VALE W.: Evidence for a physiological role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. *Endocrinology*. 116, 1367-1370, 1985.
- 119.- HILLENBJÖ T., EKHOLM C., HEDIN L.: Effect of gonadotropin releasing hormone upon the pattern of steroidogenesis in isolated preovulatory rat follicles. *Acta Endocrinol.* 105, 105-111, 1984.
- 120.- JONES P.B.C., HSUEH A.J.W.: Regulation of ovarian 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase by gonadotropin-releasing hormone and its antagonist in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem.* 14, 1169-1175, 1981.
- 121.- HSUEH A.J.W., LIU Y.-X., CAJANDER S., PENG X.-R., DAHL K., KRISTENSEN P., NY T.: Gonadotropin-releasing hormone induces ovulation in hypophysectomized rats: Studies on ovarian tissue-type plasminogen activator activity, messenger ribonucleic acid content, and cellular localization. *Endocrinology*. 122, 1486-1495, 1988.
- 122.- EKHOLM C., CLARK M.R., MAGNUSSON C., ISAKSSON O., LEMA-RIE W.J.: Ovulation induced by a gonadotropin releasing hormone analog in hypophysectomized rats involves prostaglandins. *Endocrinology*. 110, 288-293, 1982.
- 123.- GOSPADOROWICZ D. III C.R., BRIDWELL C.R.: Effect of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro I. Characterization of the response of granulosa cells for FGF and EGF. *Endocrinology*. 100, 1108-1120, 1977.

- 124.- GOSPADOROWICZ D.-III C.R., BRIDWELL C.R.: Effect of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro .II. Proliferative response of luteal cells to FGF but no EGF. *Endocrinology*. 100, 1121-1128, 1977.
- 125.- GOSPADOROWICZ D., BIALECKI H.: Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. *Endocrinology*. 104, 757-764, 1979.
- 126.- HSUEH A.J.W., WELSH T.H., JONES P.B.C.: Inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis by epidermal growth factor. *Endocrinology*. 108, 2002-2004, 1981.
- 127.- DEKEL N., SHERIZLY I.: Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology*. 116, 406-409, 1985.
- 128.- GALWAY A.B., OIKAWA M., NY T., HSUEH A.J.W.: Epidermal growth factor stimulates tissue plasminogen activator activity and messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells: Mediation by pathways independent of protein kinases -A and -C. *Endocrinology*. 125, 126-135, 1989.
- 129.- MAY J.V., BUCK P.A., SCHOMBERG D.W.: Epidermal growth factor enhances [<sup>125</sup>I]Iodo-follicle-stimulating hormone binding by cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*. 120, 2413-2420, 1987.
- 130.- ADASHI E.Y., RESNICK C.E., TWARDZIK D.R.: Transforming growth factor- $\alpha$  attenuates the acquisition of aromatase activity by cultured rat granulosa cells. *J Cell Biochem*. 33, 1-13, 1987.
- 131.- KOLENA J., CHANNING C.P.: Stimulatory effects of LH, FSH and prostaglandins upon 3'-5'-AMP levels in porcine granulosa cells. *Endocrinology*. 90, 1543-1550, 1972.
- 132.- HUNZICKER-DUNN M., BIRNBAUMER L.: Adenylyl cyclase activities in ovarian tissue. III. Regulation of responsiveness to LH, FSH and PGE<sub>1</sub> in the prepubertal, cycling pregnant and pseudopregnant rat. *Endocrinology*. 99, 198-210, 1976.
- 133.- JOHNSON G.L., DHANESEKARAN N.: The G-protein family and their interaction with receptors. *Endocr Rev*. 10, 317-331, 1989.
- 134.- BOURNE H.R.: G-protein subunits. Who carries what message?. *Nature*. 337, 504-505, 1989.
- 135.- WANG C., HSUEH A.J.W., ERICKSON G.F.: The role of cyclic AMP in the induction of estrogen and progesterin synthesis in cultured granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 25, 73-83, 1982.
- 136.- ROJAS F.J., ASCH R.H.: Effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonist and calcium upon adenylyl cyclase activity of human corpus luteum membranes. *Life Sci*. 36, 841-850, 1985.
- 137.- KNECHT M., SHINOHARA O., CATT K.: Biosynthesis of cellular and secreted proteins during follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology*. 119, 1388-1396, 1986.

- 138.- RANTA T., KNECHT M., DARRON J.-M., BAUKAL A.J., CATT K.: Induction of granulosa cell differentiation by forskolin: Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production, progesterone synthesis, and luteinizing hormone receptor expression. *Endocrinology*. 114, 845-850, 1984.
- 139.- BEN-ZE'EV A., AMSTERDAM A.: In vitro regulation of granulosa cell differentiation. *J Biol Chem*. 262, 5366-5376, 1987.
- 140.- KNECHT M., AMSTERDAM A., CATT K.J.: The regulatory role of cyclic AMP in hormone-induced granulosa cell differentiation. *J Biol Chem*. 256, 10628-10633, 1981.
- 141.- NIMROD A.: The induction of ovarian LH-receptor by FSH is mediated by cyclic AMP. *FEBS Lett*. 131, 31-33, 1981.
- 142.- KNECHT M., RANTA T., CATT K.J.: Granulosa cell differentiation in vitro: Induction and maintenance of follicle-stimulating hormone receptors by adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology*. 113, 949-956, 1983.
- 143.- KNECHT M., CATT K.J.: Gonadotropin-releasing hormone: Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate in ovarian granulosa cells. *Science*. 214, 1346-1348, 1981.
- 144.- KNECHT M., RANTA T., CATT K.J.: Hormonal regulation of a plasma membrane phosphodiesterase in differentiating granulosa cells. *J Biol Chem*. 258, 12420-12426, 1983.
- 145.- GORE-LANGTON R.E., LACROIX M., DORRINGTON J.H.: Differential effects of luteinizing-releasing hormone on follicle-stimulating hormone-dependent responses in rat granulosa cells and Sertoli cells in vitro. *Endocrinology*. 108, 812-819, 1981.
- 146.- WELSH T.H., JIA X-CH., HSUEH A.J.W.: Forskolin and phosphodiesterase inhibitors stimulate rat granulosa cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol*. 37, 51-60, 1984.
- 147.- JONASSEN J.A., RICHARDS J.S.: Granulosa cell desensitization: Effects of gonadotropins on antral and preantral follicles. *Endocrinology*. 106, 1786-1794, 1980.
- 148.- RATNER A.: Effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone upon cyclic AMP and GMP levels in rat ovaries in vitro. *Endocrinology*. 99, 1498-1500, 1976.
- 149.- SANDERS M.M., MIDGLEY A.R. Jr.: Cyclic nucleotides can induce luteinizing hormone receptor in cultured granulosa cells. *Endocrinology*. 112, 1382-1388, 1983.
- 150.- KNECHT M., KATZ M.S., CATT K.J.: Gonadotropin-releasing hormone inhibits cyclic nucleotide accumulation in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem*. 256, 34-36, 1981.
- 151.- ESHKOL A., PARIENTE C.: Regulation of granulosa cell functions by cyclic AMP and cyclic GMP. *Hormone Recep Growth Reprod*. 141-148, 1984.

- 152.- VELDHUIS J.D., KLASE P.A., DEMERS L.M., CHAFOULEAS J.-C.: Mechanisms subserving calcium's modulation of luteinizing hormone action in isolated swine granulosa cells. *Endocrinology*. 114, 441-449, 1984.
- 153.- CARNEGIE J.A., TSANG B.K.: The calcium-calmodulin system: Participation in the regulation of steroidogenesis at different stages of granulosa cell differentiation. *Biol Reprod*. 30, 515-522, 1984.
- 154.- VELDHUIS J.D., KLASE P.A.: Mechanisms by which calcium ions regulate the steroidogenic actions of luteinizing hormone in isolated ovarian cells in vitro. *Endocrinology*. 111, 1-6, 1982.
- 155.- LAHAV M., WEISS E., RAFAELOFF R., BARZILAI D.: The role of calcium ion in luteal function in the rat. *J Steroid Biochem*. 19, 805-810, 1983.
- 156.- CARNEGIE J.A., TSANG B.K.: Follicle-stimulating hormone-regulated granulosa cell steroidogenesis: Involvement of the calcium-calmodulin system. *Am J Obstet Gynecol*. 145, 223-228, 1983.
- 157.- CARNEGIE J.A., TSANG B.K., HENDERSON C.: Granulosa cell progesterone production in vitro: Effects of a stimulator and a inhibitor of cellular calcium uptake. 26th Ann Meeting Canadian Federation of Biological Societies, Ottawa, Ontario (Abstr. PA-15). 1983.
- 158.- NAOR Z., YAVIN E.: Gonadotropin-releasing hormone stimulates phospholipid labeling in cultured granulosa cells. *Endocrinology*. 111, 1615-1619, 1982.
- 159.- MA F., LEUNG C.K.: Luteinizing hormone releasing hormone enhances polyphosphoinositide breakdown in rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 130, 1201-1208, 1985.
- 160.- TSANG B.K., CARNEGIE J.A.: Calcium-dependent regulation of progesterone production by isolated rat granulosa cells: Effects of the calcium ionophore A23187, prostaglandin E<sub>2</sub>, dI-Isoproterenol and cholera toxin. *Biol Reprod*. 30, 787-794, 1984.
- 161.- HEDIN L., ROSBERG S.: Forskolin effects on the cAMP system and steroidogenesis in the immature rat ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 33, 69-80, 1983.
- 162.- GOSPADOROWICZ D., GOSPADOROWICZ F.: The morphological transformation and inhibition of growth of bovine luteal cells in tissue culture induced by luteinizing hormone and dibutiryl cyclic AMP. *Endocrinology*. 96, 458-467, 1975.
- 163.- VELDHUIS J.D., KLASE P.A.: Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. *Biochem J*. 202, 381-386, 1982.
- 164.- ASEM E.K., MOLNAR M., HERTELENDY F.: Luteinizing hormone-induced intracellular calcium mobilization in granulosa cells: Comparison with forskolin and 8-bromo-adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology*. 120, 853-859, 1987.
- 165.- DAVIS J.S., WEST L.A., FARESE R.V.: Effects of luteinizing hormone on

phosphoinositide metabolism in granulosa cells. *J Biol Chem.* 259, 15028-15034, 1984.

166.- FARESE R.V.: Phosphoinositide metabolism and hormone action. *Endocr Rev.* 4, 78-95, 1983.

167.- DORRINGTON J.H., GORE-LANGTON R.E.: Antigonadal action of prolactin: Further studies on the mechanism of inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in rat granulosa cell cultures. *Endocrinology.* 110, 1701-1707, 1982.

168.- ROSEN O.M.: After insulin binds. *Science.* 237, 1452-1458, 1987.

169.- SALTIEL A.R., CUATRECASAS P.: Insulin stimulates the generation from hepatic plasma membranes of modulators derived from an inositol glycolipid. *Proc Nat Acad Sci USA.* 83, 5793-5797, 1986.

170.- SALTIEL A.R., FOX J.A., SHERLINE P., CUATRECASAS P.: Insulin-stimulated hydrolysis of a novel glycolipid generates modulators of cAMP phosphodiesterase. *Science.* 233, 967-972, 1986.

171.- MATO J.M., KELLY K.L., ABLER A., JARETT L.: Identification of a novel insulin-sensitive glycopospholipid from H35 hepatoma cells. *J Biol Chem.* 262, 2131-2137, 1987.

172.- MATO J.M., KELLY K.L., ABLER A., JARETT L., CORKEY B. E., CASHEL J.A., ZOPF D.: Partial structure of an insulin-sensitive glycopospholipid. *Biochem Biophys Res Commun.* 146, 764-770, 1987.

173.- ADASHI E.Y., RESNICK C.E., HERNANDEZ E.R., MAY J.V., KNECHT M., SVOBODA M.E., VAN WYK J.J.: Insulin-like growth factor-I as an amplifier of follicle-stimulating hormone action: Studies on mechanism(s) and site(s) of action in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 122, 1583-1591, 1988.

174.- VELDHUIS J.D., FURNALETTO R.W.: Trophic actions of human somatomedin C/insulin-like growth factor I on ovarian cells: In vitro studies with swine granulosa cells. *Endocrinology.* 116, 1235-1242, 1985.

175.- KNECHT M., RANTA T., KATZ M.S., CATT K.J.: Regulation of adenylate cyclase activity by follicle-stimulating hormone and a gonadotropin-releasing hormone agonist in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 112, 1247-1255, 1983.

176.- RANTA T., BAUKAL A., KNECHT M., KORHONEN M., CATT K.J.: Inhibitory actions of a gonadotropin-releasing hormone agonist on ovarian follicle-stimulating hormone receptors and adenylate cyclase in vivo. *Endocrinology.* 112, 956-964, 1983.

177.- KNECHT M., CATT K.: Epidermal growth factor and gonadotropin-releasing hormone inhibit cyclic AMP-dependent luteinizing hormone receptor formation in ovarian granulosa cells. *J Cell Biochem.* 21, 209-217, 1983.

178.- DARBON J.-M., KNECHT M., RANTA T., DUFAU M.L., CATT K.J.: Hormonal regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured ovarian granulosa cells. Effects of follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hor-

mon. J Biol Chem. 259, 14778-14782, 1984.

179.- DAVIS J.S., FARESE R.V., CLARK M.R.: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulates phosphatidylinositol metabolism in rat granulosa cells: Mechanism of action of GnRH. Proc Nat Acad Sci USA. 80, 2049-2053, 1983.

180.- DAVIS J.S., WEST L.A., FARESE R.V.: Gonadotropin-releasing hormone rapidly alters polyphosphoinositide metabolism in rat granulosa cells. Biochem Biophys Res Commun. 122, 1289-1295, 1984.

181.- DAVIS J.S., WEST L.A., FARESE R.V.: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) rapidly stimulates the formation of inositol phosphate and diacylglycerol in rat granulosa cell: Further evidence for the involvement of  $Ca^{++}$  and protein kinase C in the action of GnRH. Endocrinology. 118, 2561-2571, 1986.

182.- WELSH T.H., JONES P.B.C., HSUEH A.J.W.: Phorbol ester inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis in vitro. Cancer Res. 44, 885-891, 1984.

183.- KASSON B.G., CONN P.M., HSUEH A.J.W.: Inhibition of granulosa cell differentiation by dioctanoylglycerol a novel activator of protein kinase C. Mol Cell Endocrinol. 42, 29-37, 1985.

184.- SHINOHARA O., KNECHT M., CATT K.J.: Inhibition of gonadotropin-induced granulosa cell differentiation by activation of protein kinase C. Proc Nat Acad Sci USA. 82, 8518-8522, 1985.

185.- COUNTAWAY J.L., NORTWOOD I.C., DAVIS R.: Mechanism of phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at treonine 669. J Biol Chem. 264, 10828-10835, 1989.

186.- NISHIBE S., WAHL M.I., RHEES S.G., CARPENTER G.: Tyrosine phospholipase C-II in vitro by the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem. 264, 10335-10338, 1989.

187.- ALVAREZ J.F., VARELA I., RUIZ-ALBUSAC J.M., MATO J.M.: Localisation of the insulin-sensitive phosphatidylinositol glycan at the outer surface of the cell membrane. Biochem Biophys Res Commun. 152, 1455-1462, 1988.

188.- KELLY K.L., MATO J.M., JARETT L.: The polar head group of a novel insulin-sensitive glycopospholipid mimics insulin action on phospholipid methyltransferase. FEBS Lett. 209, 238-242, 1986.

189.- KELLY K.L., MATO J.M., MERIDA I, JARETT L.: Glucose transport and anti-lipolysis are differentially regulated by the polar head group of an insulin-sensitive glycopospholipid. Proc Nat Acad Sci USA. 84, 6404-6407, 1987.

190.- LARNER J., HUANG L.C., SCHWARTZ C.F.W., OSWLAD A.S., SHEN T.Y., KINTER M., TANG G., ZELLER K.: Rat liver insulin mediator which stimulates pyruvate dehydrogenase phosphatase contains galactosamine and D-chiroinositol. Biochem Biophys Res Commun. 151, 1416-1426, 1988.

191.- VARELA I., ALVAREZ J.F., RUIZ-ALBUSAC J.M., MATO J.M.: Asymmetric distribution of the phosphatidylinositol-linked phospho-oligosaccharide that mimics insulin actions in the plasma membrane. En prensa.

- 192.- VILLALBA M., ALVAREZ J. F., RUSSELL D., MATO J. M., ROSEN O.: Hydrolysis of glycosyl-phosphatidylinositol in response to insulin is reduced in cells bearing kinase-deficient insulin receptors. *Growth Factors*. En prensa. 1989.
- 193.- GAULTON G.N., KELLY K.L., PAWLOWSKI J., MATO J.M., IARETT L.: Regulation and function of an insulin-sensitive glycosyl-phosphatidylinositol during T lymphocyte activation. *Cell*. 53, 963-970, 1988.
- 194.- COZZA E.N., VILA M.C., GOMEZ-SANCHEZ C.E., FARESE R.V.: ACTH stimulates turnover of the phosphatidylinositol glycan. *Biochem Biophys Res Commun*. 157, 585-589, 1988.
- 195.- CROSS G.A.M.: Eukaryotic protein modification and membrane attachment via phosphatidylinositol. *Cell*. 48, 179-181, 1987.
- 196.- LOW M.G.: Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem J*. 244, 1-13, 1987.
- 197.- MERIDA I., CORRALES F.J., CLEMENTE R., RUIZ-ALBUSAC, J.M., VILLALBA M., MATO J.M.: Different phosphorylated forms of an insulin-sensitive glycosyl-phosphatidylinositol from rat hepatocytes. *FEBS Lett*. 263, 251-255, 1988.
- 198.- ROMERO G., LUTTRELL L., ROGOL A., ZELLER K., HEWLETT E., LARNER J.: Phosphatidylinositol-glycan anchors of membrane proteins: Potential precursors of insulin mediators. *Science*. 240, 509-511, 1988.
- 199.- SALTIEL A.R., SHERLINE P., FOX J.A.: Insulin-stimulated diacylglycerol production results from the hydrolysis of a novel phosphatidylinositol glycan. *J Biol Chem*. 262, 1116-1121, 1987.
- 200.- FOX J.A., SOLIZ N.M., SALTIEL A.R.: Purification of a phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase C from liver plasma membranes: A possible target of insulin action. *Proc Nat Acad Sci. USA*. 84, 2663-2667, 1987.
- 201.- STRALFORS P.: Insulin stimulation of glucose uptake can be mediated by diacylglycerol in adipocytes. *Nature*. 335, 554-556, 1988.
- 202.- SALTIEL A.R., SORBARA-CAZAN L.R.: Inositol glycans mimics the action of insulin on glucose utilization in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 149, 1084-1092, 1987.
- 203.- FARESE R.V., NAIR G.P., STANDAERT M.L., COOPER D.R.: Epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I stimulate the hydrolysis of the insulin-sensitive phosphatidylinositol-glycan in BC3H-1 myocytes. *Biochem Biophys Res Comm*. 156, 1346-1352, 1988.
- 204.- CHAN B.L., CHAO M.V., SALTIEL A.R.: Nerve growth factor stimulates the hydrolysis of glycosyl-phosphatidylinositol in PC-12 cells: A mechanism of protein kinase C regulation. *Proc Nat Acad Sci Usa*. 86, 1756-1760.
- 205.- SALTIEL A.R.: Insulin generates an enzyme modulator from hepatic plasma membranes: Regulation of adenosine 3',5'- monophosphate phosphodiesterase, pyruvate dehydrogenase, and adenylate cyclase. *Endocrinology*. 120, 967-972, 1987.

- 206.- VILLALBA M., KELLY K.L., MATO J.M.: Inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by the polar head group of an insulin-sensitive glycopospholipid. *Biochim Biophys Acta.* 968, 69-76, 1988.
- 207.- KELLY K.L., MERIDA I. WONG E.H.A., DiCENZO D., MATO J.M.: A phospho-oligosaccharide mimics the effect of insulin to inhibit isoproterenol-dependent phosphorylation of phospholipid methyltransferase in isolated adipocytes. *J Biol Chem.* 262, 15282-15290, 1987.
- 208.- ALVAREZ J.F., ESTEVEZ F., GUADAÑO A., VARELA I., MATO J.M.: Insulin-sensitive transport of the phospho-oligosaccharide that mimics insulin action. En prensa. 1989.
- 209.- GOTTSCHALK K.W., JARETT L.: The insulinomimetic effects of the polar head group of an insulin-sensitive glycopospholipid on pyruvate dehydrogenase in both subcellular and whole cell assays. *Arch Biochem Biophys.* 261, 175-185, 1988.
- 210.- ALVAREZ J.F., CABELLO M.A., FELIU J.E., MATO J.M.: A phospho-oligosaccharide mimics insulin action on glycogen phosphorylase and pyruvate kinase activities in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 147, 765-771, 1987.
- 211.- ALEMANY S., MATO J.M., STRALFORS P.: Phospho-dephospho- control by insulin is mimicked by a phospho-oligosaccharide in adipocytes. *Nature.* 330, 77-79, 1987.
- 212.- FANJUL L.F., ESTEVEZ F., DENIZ A.S., MARRERO I., BENITEZ L., CENTOL I., QUINTANA J., GONZALEZ J., LLANES L., RUIZ DE GALARRETA C.M.: The androgen receptor does not mediate progesterin regulation of progesterone biosynthesis in cultured rat granulosa cells. *Biochem Internat.* 19, 977-984, 1989.
- 213.- BRADFORD M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254, 1976.
- 214.- MURONO E.P., PAYNE A.H.: Testicular maturation in the rat. In vivo effect of gonadotropins on steroidogenic enzymes in the hypophysectomized immature rats. *Biol Reprod.* 20, 911- 917, 1979.
- 215.- JONES P.B.C., HSUEH A.J.W.: Regulation of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase by gonadotropin-releasing hormone and follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 110, 1663-1671, 1982.
- 216.- FERGUSON M.A.J., LOW M.G., CROSS G.A.M.: Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein. *J Biol Chem.* 260, 14547-14555, 1985.
- 217.- LOW M.G., SALTIEL A.R.: Structural and functional roles of glycosylphosphatidylinositols in membranes. *Science.* 239, 268-275, 1987.
- 218.- ROBERTS W.L., SANTIKARN S., REINHOLD V.N., ROSENBERY T.L.: Structural characterization of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase by fast atom bombardment mass spectrometry. *J Biol Chem.* 263, 18776-18784, 1988.