

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR  
Y FISIOLÓGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)  
Y SU RELACIÓN CON OTRAS RESPUESTAS DIFERENCIADAS  
EN LA CÉLULA GRANULOSA OVÁRICA**

**CARLOS TABRAUE TARBAY**

Las Palmas de Gran Canaria, 1997

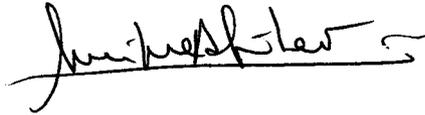
53/1996-97

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO**

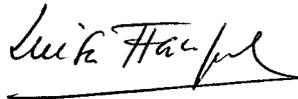
Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de Apto cum laude por Las Palmas de Gran Canaria a 11 de julio de 1997. *univ. can.*

El/a Presidente/a: Dr. D. Enrique Aguilar Benítez de Lugo,



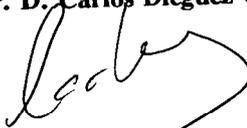
El/a Secretario/a: Dra. Dña. Luisa Fernanda Fanjul Rodríguez,



El/a Vocal: Dr. D. Fernando Domínguez Puente,



El/a Vocal: Dr. D. Carlos Dieguez González,



El/a Vocal: Dr. D. José Luis Pérez Arellano,



El/a Doctorando/a: D. Carlos Tabraue Tarbay,





BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Nº Documento.....405.701
Nº Copia.....405.709

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**REGULACION DE LA BIOSÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y  
SU RELACIÓN CON OTRAS RESPUESTAS DIFERENCIADAS EN  
LA CÉLULA GRANULOSA OVÁRICA**

**CARLOS TABRAUE TARBAY**  
**Las Palmas de Gran Canaria**  
**1997**

**Carlos Manuel Ruiz de Galarreta**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular  
**Francisco Estévez Rosas**, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular  
**José Quintana Aguiar** Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular

**CERTIFICAN:**

Que Don Carlos Tabraue Tarbay, licenciado en Biología por la Universidad de La Laguna y posteriormente becario de la ULPGC y alumno durante el bienio 92/94 del Programa de Doctorado *Fundamentos celulares y moleculares de la proliferación y diferenciación celular*, impartido por este Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología, ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión el trabajo experimental titulado *Regulación de la biosíntesis de óxido nítrico (NO) y su relación con otras respuestas diferenciadas en la célula granulosa ovárica*.

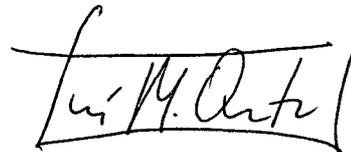
Considerando concluido el trabajo experimental y la redacción de sus conclusiones, y juzgando suficientemente novedosas las aportaciones científicas contenidas en el mismo, autorizamos su presentación y defensa para optar al grado de Doctor ante el tribunal encargado de juzgarla, y a los efectos oportunos firmamos el presente certificado.



Dr. J. Estévez Rosas



Dr. C.M. Ruiz de Galarreta



Dr. J. Quintana Aguiar

Las Palmas de Gran Canaria, a 2 de Junio de 1997

## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos *al Dr. Carlos Manuel Ruiz de Galarreta y a la Dra. Luisa Fernanda Fanjul Rodríguez* por la acogida y confianza que depositaron en mí desde que llegé al departamento, y por haberme iniciado en esa tarea tan ardua y a menudo reconfortable que es la investigación.

A *Manolo* le quiero expresar la satisfacción que me ha supuesto el haber desarrollado esta memoria bajo su tutela. Además darte las gracias por el tiempo, ganas y dedicación invertidos en ella.

*Al Dr. José Quintana y al Dr. Francisco Estévez* agradecerle la orientación que he recibido de ellos, al haberme resuelto las innumerables dudas que se me han ido planteando a través de este corto tiempo como investigador.

*Al Dr. German Gallardo* quisiera agradecerle "infinitamente" su amistad y "apoyo" que he tenido en todo momento y el poder haber compartido junto a él, nuestros primeros "pinitos" y "quesos" en el laboratorio.

A la *Lcda. Raquel Díaz* además de su amistad, agradecerle junto *al Dr. José Quintana* esa excelente colaboración con la que se ha podido llevar a buen puerto esta tesis.

A la *Dra. Pino Santana, a la Dra. Vandi Hernández y al Dr. Juan González* agradecerles su acogida en el departamento y la ayuda siempre desinteresada para resolver problemas de cualquier índole. Al igual, agradecerles todos los conocimientos que obtuve de ellos referentes a las CGO y otras técnicas de realización en el laboratorio.

A todos los demás compañeros del departamento, *al Dr. Javier Cabrera, al Dr. Ignacio González, a la Dra. Luz LLánez, a Begoña López, a Viky Morales, a José Juan Jiménez, a Sonia Valido, a Isabel, a Fefi Caballero y a Félix Cabrera*, por la ayuda que he recibido en todo momento y porque compartir con ellos el trabajo diario ha supuesto que éste sea mucho más agradable.

A *Pilar Bracero* y a *Nanda* les tengo que agradecer el asesoramiento administrativo, no menos difícil e importante.

Al *Dr. Félix López* agradecerle el tiempo que invirtió en parte de la documentación bibliográfica de esta memoria.

A los coleguitas de toda la vida, a *Nati*, a *Fran*, a *Georgina*, a *Jeanette* y a *Manolillo* por su amistad, además de los consejos, estímulos y apoyo, que necesité para la realización de este trabajo.

**A Nati y Sarah**  
**A mis Padres y Hermanos**

**ANTECEDENTES  
Y  
OBJETIVOS**

El óxido nítrico (NO) es un gas diatómico de bajo PM, altamente difusible y relativamente inestable en sistemas inorgánicos en los que presenta una alta reactividad química (Stammler *et al.*, 1992), y por esto fue inicialmente identificado como uno de los componentes contaminantes de la atmósfera potencialmente más tóxicos para los organismos vivos (Feldman *et al.*, 1993; Morris & Billiar, 1994).

La primera observación de que las especies oxidadas del nitrógeno pueden ser producidas por los organismos superiores (Mitchel *et al.*, 1916) fue largamente ignorada hasta que en fecha relativamente reciente se demostró que durante los procesos infecciosos en humanos y roedores se producía un aumento neto en la acumulación de nitratos en los fluidos biológicos (Hibbs *et al.*, 1977; Green *et al.*, 1981a y 1981b; Green *et al.*, 1982). Este hecho llevaría a identificar al macrófago activado como la primera célula eucariota capaz de sintetizar NO (Stuehr *et al.*, 1985) y, más adelante, a demostrar no sólo que este radical libre formaba parte del mecanismo de defensa frente a los patógenos, sino también que su generación dependía de la presencia del aminoácido arginina (Hibbs *et al.*, 1987 y 1988).

El interés general de la comunidad científica por este gas aumentó considerablemente al identificarse que el NO era el factor lábil responsable de la relajación vascular (Furchgott & Zawadzki, 1980; Furchgott 1984; Ignarro *et al.*, 1981 y 1987; Palmer *et al.*, 1987) y que su síntesis en las células endoteliales vasculares se realizaba a partir de la arginina (Palmer *et al.*, 1988). Por la enorme importancia de esta observación el gas NO empezó, a partir de entonces, a ser estudiado bajo una nueva perspectiva, despertándose un renovado interés por esta molécula inorgánica (Knowles & Moncada, 1994) que creció de forma exponencial al demostrarse su participación en un número creciente de procesos biológicos normales y patológicos, que culmina finalmente con su merecida nominación como **Molécula del Año**, por la revista Science en 1992 (Koshland, 1992; Culotta & Koshland, 1992).

Hoy se sabe, y se discutirá con mayor profundidad en la introducción de esta memoria, que un número creciente de células eucariotas generan NO por la acción de las

diferentes especies moleculares de óxido nítrico sintasas (NOS, EC 1.14.23.-) que se integran en una familia de proteínas caracterizada por la especificidad tisular y localización celular de sus componentes, la existencia simultánea de isoformas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina como cofactor (Bredt & Snyder, 1990; Abu-Saund & Stuehr, 1993) y de especies moleculares que ligan con gran afinidad  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina a las bajas concentraciones de la célula en reposo, y que por esta razón se definen habitualmente como enzimas con actividad catalítica independiente de este factor (Cho *et al.*, 1992; Charles *et al.*, 1993). Sin embargo, y tal y como discutiremos a lo largo de esta memoria, esta clasificación es extremadamente simple, ya que además del requerimiento diferencial de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina y oxígeno molecular, todas las formas de NOS utilizan una cohorte común de coenzimas que incluyen NADPH, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) para expresar su máxima actividad catalítica (Feldman *et al.*, 1993; Gross & Levi, 1993; Marletta, 1993 y 1994; Nathan & Hibbs, 1991; Nathan 1992 y 1994).

Aunque todas las formas moleculares de NOS generan NO a partir de una reacción del grupo guanidino terminal de la arginina que se convierte en citrulina (Hibbs *et al.*, 1987 y 1988; Palmer *et al.*, 1988), la actividad catalítica de las isoformas regulables por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina se expresa constitutivamente en los endotelios vasculares (Inagami *et al.*, 1994; Umans & Levi, 1995; Cooke & Dzau, 1997), neuronas del sistema nervioso central y periférico (Zhang & Snyder, 1995; Dawson *et al.*, 1996) y otros tejidos (Fösterman *et al.*, 1993; Moncada & Higgs, 1993; Bredt & Snyder, 1994; Knowles & Moncada, 1994; Radomski & Salas, 1995) y se caracterizan todas ellas por generar de forma breve y transitoria cantidades nanomolares de NO en respuesta a agentes extracelulares que aumentan la concentración de calcio intracelular (Bredt & Snyder, 1994).

La actividad de las especies moleculares definidas como independientes del cofactor  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina para su máxima actividad catalítica, fueron inicialmente descritas en macrófagos (Hibbs *et al.*, 1977), no se localizan en las células en reposo, su síntesis es inducida en respuesta a endotoxinas (LPS bacteriano) o citoquinas ( $\text{IL1}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  entre otras) tanto en células inmunocompetentes (monocitos/macrófagos) como en otros tipos

celulares (Morris & Billiar, 1994), y su síntesis viene acompañada de una producción elevada y prolongada de NO.

En todos los casos sin embargo, y una vez producido, el NO actúa como un mensajero intra- e intercelular que participa en la regulación de un espectro amplio de procesos biológicos que incluyen no sólo el control de la presión arterial, la coagulación sanguínea, la transmisión del impulso nervioso, la respuesta inflamatoria, el mantenimiento de la erección en el macho, la muerte celular programada (apoptosis) y la diferenciación y proliferación celular (Nathan & Hibbs, 1991; Moncada *et al.*, 1991; Nathan, 1992; Sheng *et al.*, 1992; Bredt & Snyder, 1994), sino también un número en continuo aumento de otras respuestas biológicas (Knowles & Moncada, 1994).

En este sentido, la generación del radical libre NO ejerce no sólo efectos reguladores importantes sobre la secreción de diferentes hormonas implicadas en la regulación endocrina general (Schmidt *et al.*, 1992; Corbett *et al.*, 1993; Costa *et al.*, 1996) sino también de la prolactina (Duvilansky *et al.*, 1995), de las hormonas gonadotropas hipofisarias (LH y FSH) que juegan un papel central en el proceso reproductor (Kato 1992; Rettori *et al.*, 1993; Ceccatteli *et al.*, 1993). Pero los efectos sobre la función reproductora del NO son mas amplias, ya que el radical libre es capaz de modular directamente la esteroidogénesis en la célula de Leydig testicular (Adams *et al.*, 1992, 1993 y 1994; del Punta *et al.*, 1996) y de la célula granulosa ovárica (Van Vooris *et al.*, 1994), las dos entidades celulares encargadas de la producción de hormonas sexuales masculinas y femeninas (Miller, 1988; Greenwald & Terranova, 1988; Tonetta & DiZerega, 1990; Leung & Steele, 1992).

Aparte del bien conocido papel de las hormonas gonadotropas FSH y LH, como promotoras durante cada ciclo reproductivo del desarrollo folicular (Richards *et al.*, 1987; Richards, 1994), las citoquinas (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , INF $\gamma$ ) producidas por las células granulosa folicular (CGO), las de la teca/intersticio o los macrófagos tisulares residentes del ovario juegan un papel importante en la regulación de la fisiología reproductora que incluye: efectos inhibidores sobre la esteroidogénesis y diferenciación de la CGO (Gorospe *et al.*, 1988;

Gottschal *et al.*, 1988a y 1988b; Gottschal *et al.*, 1989; Roby & Terranova, 1988 y 1990; Adashi, 1989 & 1990; Adashi *et al.*, 199; Adashi & Richards, 1991; Kasson & Gorospe, 1989; Xiao & Findlay, 1992), participación en el proceso inflamatorio que precede a la ruptura del folículo y la liberación de uno o más óvulos maduros (Espey, 1980; Sirois *et al.*, 1992; Sirois & Richards, 1993) y, finalmente, inducción de los cambios degenerativos implicados en la atresia folicular y regresión del cuerpo luteo (Hsueh *et al.*, 1994; Chun *et al.*, 1995; Kaipia & Hsueh, 1997).

Aunque algunos de los efectos de la IL1 $\beta$  en el ovario se han relacionado con su capacidad de generar NO (Burnett *et al.*, 1995), no existe por el momento un criterio unánime sobre cuál puede ser el papel del radical libre como mediador de las diferentes respuestas celulares inducidas por la citoquina, ya que hasta el momento se han descrito efectos divergentes para el autacoide que incluyen en unos casos respuestas citotóxicas (Elfmann *et al.*, 1993) mientras que en otros se le atribuye al NO la capacidad de prevenir la apoptosis de los folículos preovulatorios (Chun *et al.*, 1995) y/o su posible papel mediador en el proceso inflamatorio (Espey, 1980) que caracteriza la ruptura del folículo ovárico y la liberación de gametos (Shcukowski & Tsafriri, 1994; Ben-Schlomo *et al.*, 1994a y 1994b).

En base a los escasos datos anteriores, pero teniendo en cuenta la versatilidad del NO como mensajero intra- e intercelular en diversos órganos y sistemas, parece evidente que el NO pueda jugar un papel relevante sobre la función ovárica que permanece en gran medida sin explorar, y que nos hemos propuesto estudiar en esta memoria.

De forma más precisa, en la presente propuesta se propone la investigación de los siguientes objetivos científicos generales:

- i)* Localizar/caracterizar que línea(s) celulares presentes en la gónada femenina son total o parcialmente responsables de la generación intraovárica de NO.
- ii)* Definir, en su caso, que tipo de NOS se expresa en estas células y cuales los mecanismos implicados en la regulación de su actividad en respuesta a

citoquinas y hormonas.

- iii)* Estudiar en que forma se interrelacionan diferentes sistemas de segundos mensajeros en el proceso de generación de NO en células ováricas.
- iv)* Aportar evidencias sobre la necesidad de BH<sub>4</sub> para la actividad de la NOS en el ovario y demostrar el papel fisiológico de este cofactor en el proceso de diferenciación de la célula granulosa ovárica.
- v)* Investigar la contribución relativa entre la ceramida y el NO como segundos mensajeros implicados en la respuesta a IL1 $\beta$  en estas células, y mas concretamente en lo que a generación de prostaglandina E<sub>2</sub>, el otro posible e importante mediador del proceso ovulatorio secretado por la CGO, se refiere.

Para aclarar estas cuestiones, metodológicamente hemos estructurado el presente estudio de la forma que se detalla en el índice que se expone a continuación.

AMERICAN  
ASSOCIATION FOR THE  
ADVANCEMENT OF  
SCIENCE

# SCIENCE

18 DECEMBER 1992  
VOL. 258 • PAGES 1853-2008

\$6.00

JUST SAY  
**NO**

MOLECULE OF  
THE YEAR

# ÍNDICE

**1. INTRODUCCIÓN.**

- 1.1. Naturaleza y propiedades químicas del óxido nítrico (NO) como radical libre.*
- 1.2. El óxido nítrico en los sistemas biológicos.*
- 1.3. Respuestas biológicas inducidas por el NO.*
- 1.4. La biogénesis del NO en las células de mamífero se debe a una familia de enzimas específica de tejido y regulada de forma diferenciada.*
- 1.5. Las isoformas de óxido nítrico sintasa (NOS) como condicionantes del papel regulador del NO.*
- 1.6. Clasificación de los diferentes tipos de óxido nítrico sintasa.*
- 1.7. Regulación endocrina, paracrina y autocrina del desarrollo, y atresia del folículo ovárico: participación de la célula granulosa.*
- 1.8. Papel de las citoquinas IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , y del óxido nítrico (NO) en la regulación de la función de la célula granulosa y en la maduración y atresia folicular.*

**2. MATERIAL Y MÉTODOS.**

**2.1. Productos utilizados.**

- 2.1.1. Precursores radioactivos.*
- 2.1.2. Hormonas, factores de crecimiento y otros tratamientos.*
- 2.1.3. Agentes farmacológicos utilizados en el estudio de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) y de las vías "de novo" y salvamento implicadas en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina (BH4).*
- 2.1.4. Productos y material para los cultivos celulares.*
- 2.1.5. Productos y material cromatográfico y de electroforesis.*
- 2.1.6. Otros productos de laboratorio.*
- 2.1.7. Productos de biología molecular usados en las técnicas de RT-PCR.*

**2.2 Modelos experimentales**

- 2.2.1. *Cultivo primario de células granulosa ovárica.*
- 2.2.2. *Cultivo de células tumorales murinas de Leydig (clon MA-10).*
- 2.2.3. *Cultivo de macrófagos murinos J774.*

**2.3. Métodos analíticos utilizados para la determinación de la actividad de la vía del óxido nítrico.**

- 2.3.1. *Determinación de nitritos.*
- 2.3.2. *Determinación directa de la actividad enzimática de iNOS en células intactas.*
- 2.3.3. *Estudio de la expresión de iNOS y GTP-ciclohidrolasa.*
- 2.3.4. *Determinación de iNOS por western-blott.*
- 2.3.5. *Determinación de tetrahidrobiopterina (BH4).*
  - \* *Oxidación de biopterina y de sus formas reducidas.*
  - \* *Preparación de muestras para la determinación de BH4 intracelular.*
  - \* *Preparación de muestras para la determinación de pteridinas en los medios extracelulares.*
  - \* *Cuantificación de pteridinas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).*

**2.4. Evaluación de la actividad esteroidogénica de la célula granulosa ovárica.**

- 2.4.1. *Radioinmunoensayo de progesterona.*
- 2.4.2. *Ensayo de la actividad del enzima P450AROM.*
- 2.4.3. *Estudio por RT-PCR de la expresión de los enzimas P450SCC, 3 $\beta$ HSD y P450AROM en célula granulosa ovárica.*

**2.5. Estudio de la vía de la biosíntesis de prostaglandinas en célula granulosa ovárica.**

*2.5.1. Radioinmunoensayo de prostaglandina E<sub>2</sub>.*

*2.5.2. Determinación de COX-2 por western-blott.*

*2.5.3. Estudio por RT-PCR de la expresión del mRNA de la prostaglandina endoperóxido sintasa/ciclooxigenasa tipo-2 (COX-2) en célula granulosa ovárica.*

**2.6. Métodos de amplificación de mRNA usando técnicas de transcriptasa inversa-reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR).**

*2.6.1. Aislamiento de RNA total.*

*2.6.2. Síntesis de cDNA.*

*2.6.3. Amplificación por reacción de la polimerasa en cadena (PCR).*

*2.6.4. Separación y detección de los productos amplificados.*

**2.7. Otros métodos.**

*2.7.1. Determinación de proteínas.*

*2.7.2. Ensayo de la viabilidad celular.*

*2.7.3. Métodos estadísticos.*

**3. RESULTADOS**

*3.1. Estimulación de la actividad NOS en célula granulosa ovárica tratadas con IL1 $\beta$ , FSH y análogos permeables del AMPc.*

*3.2. Análisis por RT-PCR y Western-blott de los efectos amplificadores de la FSH sobre la actividad NOS en célula granulosa ovárica.*

*3.3. El efecto de la IL1 $\beta$  sobre la actividad NOS y producción de NO es específico y no es observado con otros agonistas.*

- 3.4. *Papel de la biosíntesis de BH4 por la vía de "novo" y de salvamento sobre la actividad enzimática de iNOS en célula granulosa ovárica.*
- 3.5. *¿Cuál es la función del BH4 sintetizado por la vía de "novo" en célula granulosa ovárica estimulada con FSH ?.*
- 3.6. *¿Cuál es el mecanismo de señalización intracelular implicado en la inducción de iNOS por IL1 $\beta$  en célula granulosa ovárica?.*

#### **4. DISCUSIÓN**

- 4.1. *Identificación de un sistema de generación de NO localizado en la célula granulosa ovárica: papel de la IL1 $\beta$  y la FSH en el proceso.*
- 4.2. *Los niveles intracelulares de tetrahidrobiopterina juegan un papel importante en la regulación de la esteroidogénesis en célula granulosa ovárica.*
- 4.3. *Relación entre ceramida y NO en la regulación de la biosíntesis de prostaglandinas en célula granulosa ovárica: efectos divergentes del TNF y la IL1 $\beta$ .*

#### **5. CONCLUSIONES.**

#### **6. BIBLIOGRAFÍA**

**RELACIÓN DE  
FIGURAS Y TABLAS**

**1. Introducción.**

- Fig. 1.1. Estructura y reactividad química del NO como radical libre.*
- Fig. 1.2. Mecanismo de generación del NO.*
- Fig. 1.3. Coenzimas utilizados por la NOS.*
- Fig. 1.4. Modelo propuesto para la asociación y disociación de unidades diméricas de NOS.*
- Tabla I. Clasificación de las diferentes enzimas generadoras de NO.*

**2. Material y métodos.**

- Fig. 2.1. Agentes farmacológicos usados para investigar la vía del óxido nítrico en esta memoria.*
- Fig. 2.2. Inhibidores y precursores de la biosíntesis de la tetrahidrobiopterina utilizados en la presente memoria.*
- Fig. 2.3. Esquema de la obtención de CGO.*
- Fig. 2.4. Reacción espectrofotométrica para la determinación de nitritos.*
- Fig. 2.5. Linealidad de la reacción de Griess y correlación entre la determinación de  $\text{NO}_2^-$  y especies oxidadas totales del NO ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ).*
- Fig. 2.6. Método de determinación simultánea de nitritos y actividad NOS como conversión de [3H]arginina en [3H]citrulina en macrófagos J774.*
- Tabla II. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los distintos enzimas estudiados en esta memoria.*
- Fig. 2.7. Linealidad de la señal de amplificación de iNOS, GTPCH y L19 respecto al número de ciclos y cantidad de RNA.*
- Fig. 2.8. Estructura química de las pteridinas y oxidación de sus formas reducidas.*
- Fig. 2.9. Separación de las distintas pteridinas mediante HPLC y curva de calibración típica de biopterina.*
- Fig. 2.10. Curvas típicas de los radioinmunoensayos de progesterona y prostaglandinas*

*(PGE<sub>2</sub>).*

*Tabla III. Protocolos usados para la amplificación de los distintos mRNA por RT-PCR.*

*Tabla IV. Método de revelado por quimioluminiscencia de los productos de amplificación de los distintos genes estudiados.*

### **3. Resultados.**

*Fig. 3.1. Efecto del tratamiento con IL1 $\beta$  y FSH sobre la actividad de óxido nítrico sintasa en célula granulosa ovárica.*

*Fig. 3.2. La generación de NO inducida por IL1 $\beta$  y FSH es dependiente de la dosis y del tiempo de incubación en célula granulosa ovárica.*

*Fig. 3.3 Análisis por RT-PCR e inmunoblot de los efectos de la IL1 $\beta$  y FSH sobre la actividad NOS en célula granulosa ovárica.*

*Fig. 3.4. Análisis por RT-PCR de la expresión del mRNA de iNOS y GTPCH en células granulosa tratadas durante tiempos variables con IL1 $\beta$  y FSH.*

*Fig. 3.5. Especificidad de la IL1 $\beta$  como estimuladora de la actividad NOS en célula granulosa ovárica.*

*Fig 3.6. Efecto del antagonista del receptor de IL1 $\beta$  sobre la acumulación de nitritos y expresión del mRNA de iNOS y GTPCH.*

*Fig. 3.7. La actividad de iNOS es dependiente de BH4 en célula granulosa ovárica.*

*Fig. 3.8. La inhibición de la biosíntesis de BH4 en células tratadas con FSH, juega un papel importante en la esteroidogénesis inducida por la gonadotropina.*

*Fig. 3.9. La acumulación de BH4 regula la expresión de los enzimas esteroidogénicos en célula granulosa tratadas con FSH.*

*Fig. 3.10. El aumento de la concentración intracelular de BH4 es suficiente para regular la expresión de los enzimas implicados en la biosíntesis de progesterona en célula granulosa ovárica.*

*Fig. 3.11. El uso del metrotexato para inhibir la dihidrofolato reductasa antagoniza los efectos de la sepiapterina sobre la esteroidogénesis en célula granulosa*

*ovárica.*

- Fig. 3.12.** *Al aumentar la concentración intracelular de BH4 se potencian los efectos de la FSH y se adelanta la inducción de los enzimas esteroideogénicos en célula granulosa ovárica.*
- Fig. 3.13.** *La generación de ceramida reproduce los efectos inhibitorios que induce la IL1 $\beta$  sobre la esteroideogénesis estimulada por FSH en célula granulosa ovárica.*
- Fig. 3.14.** *La generación de ceramida no reproduce los efectos de IL1 $\beta$  sobre la biosíntesis de NO y prostaglandinas en célula granulosa ovárica..*
- Fig. 3.15.** *Los inhibidores de la NOS bloquean la biosíntesis de PGE<sub>2</sub> y los niveles de COX-2 inmunoreactiva en célula granulosa ovárica tratada con IL1 $\beta$ .*
- Fig. 3.16.** *El NO aumenta los efectos de la ceramida sobre la biosíntesis de PGE<sub>2</sub> en célula granulosa ovárica.*

**ABREVIATURAS**

<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa
<b>AETU</b>	2-(2-aminoetil)2-tio-pseudourea
<b>AMPc</b>	3',5' Adenosina monofosfato cíclico
<b>ATFs</b>	Factores activadores de la transcripción
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tetrahidrobiopterina
<b>BH<sub>2</sub></b>	Dihidrobiopterina
<b>But<sub>2</sub>cAMP</b>	Dibutiril AMPc
<b>But<sub>2</sub>cGMP</b>	Dibutiril GMPc
<b>Ca<sup>2+</sup>/CAM</b>	Calcio/Calmodulina
<b>C2-cer</b>	C2-ceramida (N-acetil esfingosina)
<b>C6-cer</b>	C6-ceramida (N-hexanoil esfingosina)
<b>Cer</b>	Ceramida (N-acil esfingosina)
<b>hCG</b>	Hormona gonadotropina coriónica humana
<b>CGO</b>	Célula granulosa ovárica
<b>COX-2</b>	Prostaglandina-endoperóxido sintasa/ciclooxigenasa
<b>CPTIO</b>	2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
<b>CREB</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta cAMP
<b>CREM</b>	Proteína moduladora del elemento de respuesta cAMP
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>DAHP</b>	2,4-diamino-6-hidroxi-pirimidina
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>DES</b>	Dietilestilbestrol
<b>DHFR</b>	Dihidrofolato reductasa
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico básico
<b>FAD</b>	Flavín-adenina mononucleótido (forma oxidada)
<b>FK</b>	Forskolín
<b>FMN</b>	Flavín mononucleótido
<b>FSH</b>	Hormona Folículo estimulante
<b>GCs</b>	Guanilato ciclasa soluble
<b>GMPc</b>	3',5' Guanosina monofosfato cíclico
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>GTPCH</b>	Guanosina trifosfato ciclohidrolasa
<b>3BHSD</b>	Enzima 3β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa/Δ <sup>5</sup> -Δ <sup>4</sup> Isomerasa (E.C. 1.1.1.51)
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia
<b>ICER</b>	Represor inducible del CRE
<b>IFN<sub>γ</sub></b>	Interferon <sub>γ</sub>

## Relación de Figuras y Tablas

<b>IGF-I</b>	Factor de crecimiento análogo a la insulina tipo I
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Interleukina 1 $\beta$
<b>dNTP</b>	Deoxinucleotido trifosfatos
<b>L-NAME</b>	N <sup>w</sup> -nitro-L-arginina metil ester
<b>D-NAME</b>	N <sup>w</sup> -nitro-D-arginina metil ester
<b>LY-83,583</b>	6-anilino-5,8-quinolinequinona
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MB</b>	Azul de metileno
<b>MTT</b>	Bromuro de [3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium]
<b>MTX</b>	Metrotexato
<b>cNOS</b>	Óxido nítrico sintasa constitutiva
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NPS</b>	Nitroprusiato sódico
<b>P450<sub>AROM</sub></b>	P450 <sub>AROM</sub> aromatasa
<b>P450<sub>scc</sub></b>	Enzima desramificante del colesterol citocromo P450
<b>pd(T)</b>	Polideoxitimidina
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PLA2</b>	Fosfolipasa A2
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PMSG</b>	Gonadotropina del suero de yegua preñada
<b>PP2A</b>	Proteína fosfatasa nuclear tipo 2A
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>RT</b>	Transcriptasa reversa
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SEP</b>	Sepiapterina
<b>SM</b>	Esfingomielina (N-acilesfingosin-1-fosfocolina)
<b>SMasa</b>	Esfingomielinasa (Esfingomielina-fosfodiesterasa)
<b>SMT</b>	S-metil-L-tiocitrulina
<b>SNOG</b>	S-nitrosoglutatión
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor necrótico tumoral $\alpha$
<b>VitD<sub>3</sub></b>	Vitamina D <sub>3</sub>
<b>bZIP</b>	Factor activador de la transcripción de la familia de cremalleras de leucina

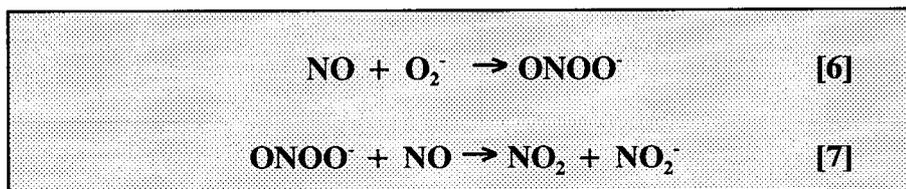
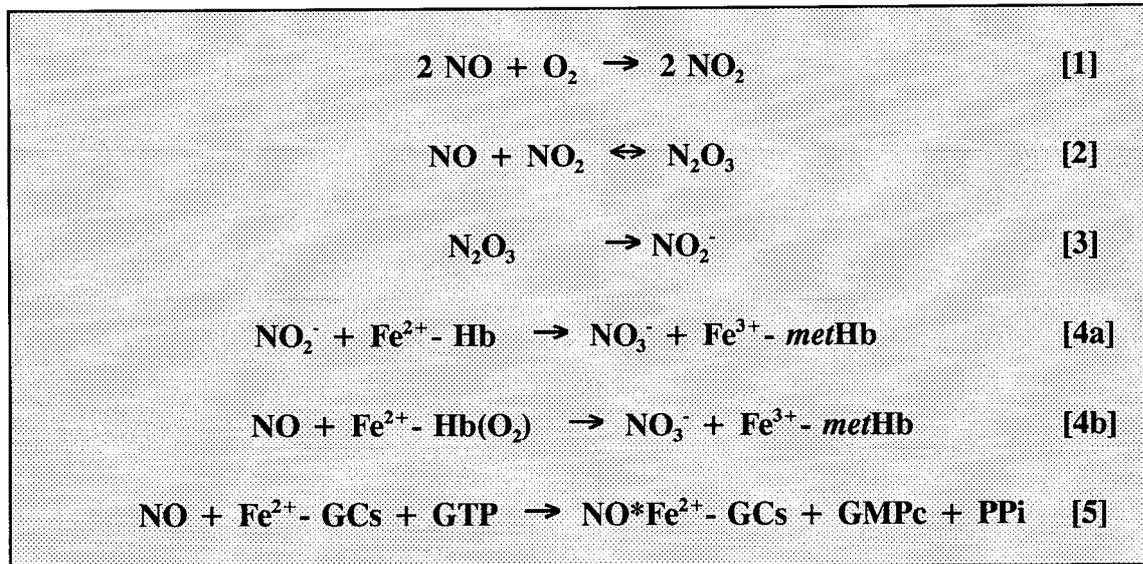
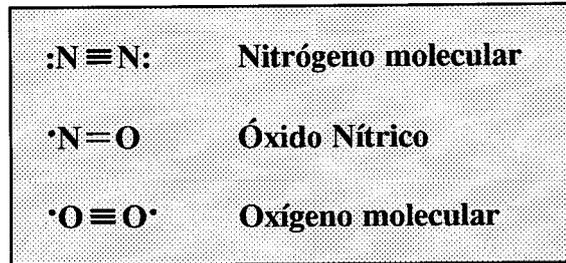
# INTRODUCCIÓN

**1.1. Naturaleza y propiedades químicas del óxido nítrico (NO) como radical libre.** El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa de bajo PM que presenta una distancia interatómica de 1,15 Å intermedia entre los 1,20 Å que cabría esperar para una unión formada por un enlace simple N-O y los 1,06 Å que caracterizan la existencia de un triple enlace (N≡O) entre sus átomos (Beckman & Koppenol, 1996). Desde el punto de vista de la química inorgánica el NO es la molécula más simple de la familia de los óxidos del nitrógeno, compuestos gaseosos con estructuras moleculares, propiedades físicas y reactividad química claramente diferenciadas (Stammler *et al.*, 1992; Janzen *et al.*, 1993; Janzen, 1994).

Las propiedades físicas más relevantes de esta molécula diatómica, consecuentes con su bajo peso molecular y su naturaleza diatómica, son las de un gas difusible, incoloro y solo moderadamente soluble (la concentración saturante en disolución es ~2 Mm) en agua (Stammler *et al.*, 1992). Aunque el NO es una especie molecular neutra, al estar su estructura electrónica formada por siete electrones del nitrógeno y ocho electrones del oxígeno, un orbital molecular antienlazante ( $2P-\pi$ ) permanece ocupado por un solo electrón que le confiere a la especie propiedades moleculares paramagnéticas y, al mismo tiempo, la característica estructural de un radical libre (**Figura 1.1**, panel superior).

Su naturaleza radicalaria es responsable de su alta reactividad química y corta vida media en soluciones acuosas, donde se oxida rápidamente a nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), por un proceso que se explica habitualmente por el mecanismo extremadamente simplificado, pero en general aceptado, que se muestra en la **Figura 1.1** (panel intermedio). En fase gaseosa (o condiciones ideales de soluciones muy diluidas), el NO es capaz de reaccionar con el bi-radical oxígeno molecular (Feldman *et al.*, 1993) para formar (Reacción 1) el oxidante fuerte dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ), molécula que en un sistema binario simple reacciona de forma reversible con otra molécula de NO (Reacción 2) para formar el trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) que a su vez en fase acuosa puede adicionar agua (Reacción 3) y convertirse en  $\text{NO}_2^-$  el producto estable final del NO en disolución (Feldman *et al.*, 1993; Janzen *et al.*, 1993; Janzen, 1994).

Figura 1.1. Estructura y Reactividad química del NO.



**Panel superior:** Estructura electrónica comparativa del nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ), el radical óxido nítrico (NO) y la estructura de biradical del oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ).

**Panel intermedio:** Esquema simplificado propuesto para explicar la limitada vida media del NO en disolución diluida, y su biotransformación en sistemas biológicos interactuando con proteínas con grupos  $\text{Fe}^{2+}$  que en el caso de la hemoglobina implica oxidación a metHb, o la formación de aductos metal-nitrosilo, caso de Guanilato ciclasa soluble (GCs) que genera GMPc por un mecanismo que implica sólo cambio conformacional del enzima.

**Panel inferior:** El NO es capaz de reaccionar con el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) generado durante la respiración celular para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), una especie molecular estable y extremadamente reactiva que media mucho de los efectos tóxicos del NO, y que puede convertirse en los compuestos  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_2^-$ .

En muchas condiciones experimentales, tanto en sistemas biológicos como inorgánicos, el  $\text{NO}_2^-$  se convierte en  $\text{NO}_3^-$  que es la especie mayoritariamente detectable en fluidos biológicos por los métodos químicos usuales (Mitchel *et al.*, 1916; Green *et al.*, 1981a y 1981b; Stuhler & Marletta, 1985). Existen dos posibles mecanismos para explicar este paso oxidativo final del NO en los sistemas biológicos que incluyen, por un lado, la capacidad del  $\text{NO}_2^-$  para oxidarse a  $\text{NO}_3^-$  en los glóbulos rojos después de reaccionar con el  $\text{Fe}^{2+}$  del grupo hemo (reacción 4a) o, de forma alternativa pero no excluyente, el mecanismo por el que se genera esta especie oxidada ( $\text{NO}_3^-$ ) *in vivo* puede ser por reacción directa entre el NO y el biradical  $\text{O}_2$  unido a la hemoglobina oxigenada (Reacción 4b).

Sin embargo y tal y como se muestra también en la **Figura 1.1** (panel inferior) el NO es capaz de reaccionar con el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) generado durante la respiración celular para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) una especie molecular estable, pero extremadamente reactiva y tóxica que media muchas de los efectos celulares adversos del NO (Butler *et al.*, 1995; Beckman & Koppenol, 1996).

**1.2. El óxido nítrico en los sistemas biológicos.** Aunque hoy se admite de forma unánime que el NO es una entidad gaseosa que participa en la regulación de muchos procesos biológicos, la incorporación de este radical libre al mundo de la biología ha sido relativamente reciente, y su consagración real como un mediador relevante de procesos fisiológicos y patológicos en los mamíferos solo se reconoció, aunque con todos los honores, en fecha tan cercana como 1992 (Culotta & Koshland, 1992).

Conocida su alta reactividad química típica de radical libre, el reconocimiento del NO como un componente minoritario en la atmósfera llevó inicialmente a postularlo como un contaminante medioambiental, mas adelante identificado en procesos como la destrucción de la capa de ozono y la generación de la lluvia ácida (Culotta & Koshland, 1992) al mismo tiempo que se le atribuían propiedades potencialmente carcinogénicas y tóxicas para los organismos superiores (Feldman *et al.*, 1993).

La observación inicial de que las cantidades de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  eliminados en la orina de los mamíferos (incluido el hombre) era superior a su contenido potencial en los componentes de la dieta (Mitchel *et al.*, 1916) fue mayoritariamente ignorada por la comunidad científica, y la presencia de estas especies oxidadas del NO en los fluidos biológicos se atribuyó a posibles procesos de nitrificación realizados por las bacterias de la flora intestinal (Feldman *et al.*, 1993; Morris & Billiar, 1991).

La extrema simplicidad molecular del NO fue, al menos en parte, responsable del largo camino recorrido por este radical gaseoso hasta su reconocimiento actual como molécula que regula procesos vitales fundamentales en los organismos superiores (Moncada *et al.*, 1991; Moncada & Higgs, 1993). No es extraño que esto sucediera, ya que conceptualmente es difícil atribuirle a una molécula diatómica sencilla la especificidad necesaria para el control de respuestas celulares discretas (Nathan, 1992). La entrada del NO en el mundo de la Biología se produce solo gracias a los estudios, relativamente recientes, en cuatro líneas de investigación convergentes en los campos de la toxicología (Green *et al.*, 1981a y 1981b), la farmacología cardiovascular (Furchgott, 1980; Furchgott & Zawadski, 1980; Ignarro *et al.*, 1981 y 1987; Palmer *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1989) la inmunología (Hibbs *et al.*, 1977; Stuehr & Marletta, 1985) y la neurobiología (Garthwaite *et al.*, 1988), tal y como pasamos a continuación a detallar (Moncada *et al.*, 1991).

Desde un punto de vista histórico y después de las observaciones pioneras (Mitchel *et al.*, 1916) la primera vez que se admitió a los óxidos superiores del nitrógeno ( $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) como productos cuantitativamente significativos producidos durante el metabolismo de los mamíferos fue durante el estudio toxicológico de nitrosaminas en procesos infecciosos (Green *et al.*, 1981a y 1981b). La generación del radical libre por las células de mamífero se corroboró más tarde en ratones expuestos a agentes infecciosos, demostrándose que los macrófagos encargados de la primera línea en la defensa inmune inespecífica generaban grandes cantidades de NO, y que este mecanismo *in vitro* era dependiente de la concentración de arginina en el medio de incubación (Hibbs *et al.*, 1977; Stuehr & Marletta, 1985; Stuehr *et al.*, 1985).

Aunque la participación del NO en la regulación del tono vascular puede remontarse a los más de cien años de la utilización empírica de la nitroglicerina para dilatar las arterias y aumentar el riego cardiaco durante los procesos de angina de pecho (Ignamani *et al.*, 1995; Moncada & Higgs, 1993), el fundamento farmacológico de este tratamiento solo se estableció al demostrarse que en respuesta a la acetilcolina las células del endotelio vascular generaban un "factor relajante derivado del endotelio" (EDRF) que difunde y relaja las células musculares lisas de los vasos adyacentes (Furchgott, 1980; Furchgott & Zawadski, 1980), y que más tarde se identificaría como el radical libre NO (Ignarro *et al.*, 1981 y 1987; Palmer *et al.*, 1987 y 1988; Palmer & Moncada, 1989).

Por lo inesperado, la expectación creada en torno al papel biológico del NO aumentó considerablemente al demostrarse que la estimulación del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) que juega un papel primordial en la transmisión del impulso nervioso inducía la liberación de NO en cortes de cerebro (Garthwait *et al.*, 1988; Bredt & Snyder, 1989), hecho que sentó las bases para el descubrimiento de un nuevo sistema de señalización en neuronas del sistema nervioso central y periférico (Garthwait & Boulton, 1995; Rand & Li, 1995; Dawson *et al.*, 1996)

**1.3. Respuestas biológicas inducidas por el NO.** Como ya hemos dicho la estructura extremadamente sencilla del NO hizo conceptualmente difícil integrar a esta entidad química como molécula implicada en la regulación de procesos biológicos que fueran mas allá de su toxicidad como contaminante medioambiental (Stammler *et al.*, 1992; Culotta & Koshland, 1992; Moncada & Higgs, 1993; Beckman & Koppenol, 1996), pues a diferencia de la alta especificidad de los receptores hormonales, capaces incluso de discriminar entre moléculas estructuralmente tan relacionadas como epinefrina y norepinefrina, es cierto que la simplicidad y rigidez molecular del NO no permite que la regulación de respuestas celulares por este radical sea mediada por receptores celulares específicos (Moncada *et al.*, 1991; Culotta & Koshland, 1992; Lowenstein & Snyder, 1992; Bredt & Snyder, 1991).

Al contrario, por tanto, que otras moléculas implicadas en los procesos biológicos de

señalización y comunicación intercelular, la capacidad del NO para inducir respuestas celulares específicas dependerá, más que de consideraciones derivadas de su conformación espacial, de factores asociados a su naturaleza química simple, entre los que se pueden incluir: *i*) su alta capacidad de difusión a través de las membranas biológicas que le permite alcanzar altas concentraciones locales en una célula dada (Moncada & Higgs, 1993; Nathan & Xie, 1994; Griffithh & Stuehr, 1995; Beckman & Koppenol, 1996); *ii*) del lugar (tipo celular/tejido) en que se produce su síntesis (Stammler *et al.*, 1992); *iii*) por su naturaleza de "radical libre" y su corta vida media en sistemas biológicos y no biológicos, de la forma en que es regulada de forma espacial y temporal su propia síntesis, que es el auténtico mecanismo de regulación de las respuestas celulares inducidas por el radical libre (Nathan & Qiao-wen Xie, 1993; Griffith & Stuehr, 1995).

No obstante, es conveniente matizar que la alta reactividad química que se le atribuye de forma generalizada en los sistemas biológicos es, sin embargo, incompatible con la estructura molecular del NO con un único electrón cortical desapareado (**Figura 1.1**, panel superior). Este hecho, frecuentemente olvidado, se debe a que las moléculas biológicas tienen sus orbitales ocupados por dos electrones con número cuántico de "spin" opuesto, que por tanto condicionan y limitan la capacidad del NO para reaccionar directamente con ellas (Padmaja & Huie, 1993; Rubbo *et al.*, 1994).

Debido a la existencia de este único electrón cortical desapareado la reactividad química del NO queda considerablemente limitada a interactuar con otros radicales libres (fundamentalmente especies reactivas del oxígeno) o con metales de transición (**Figura 1.1**), por lo que las múltiples respuestas biológicas inducidas por el NO se pueden interpretar solo categorizando sus efectos en dos grandes apartados que van a depender del tipo celular y/o, como ya hemos visto dependerá de los niveles reales de autacoide generado en un sitio/lugar concreto y una pauta determinada (Griffith & Stuehr, 1995).

Se consideran efectos directos del NO aquellos en los que el gas diatómico reacciona directamente con la molécula diana para inducir respuestas biológicas (**Figura 1.1**) modelo

cuyo paradigma puede considerarse la reacción con el grupo ferro-porfirina de la hemoglobina (Stammler *et al.*, 1992; Stone & Marletta, 1994; Stone *et al.*, 1995) y que puede generalizarse para otras metaloproteínas portadoras de metales de transición (Reacción 5) como la Guanilato ciclasa soluble (GCs) intracelular (Arnold *et al.*, 1987; Bredt & Snyder, 1989; Griffith & Stuart, 1995) y otros enzimas que contienen grupos Fe<sup>2+</sup>-hemo como los citocromos P450 (Khatsenko & Kikkawa, 1997; Oguro *et al.*, 1997).

Por otro lado, se habla de efectos indirectos cuando a concentraciones de NO elevadas (10-20  $\mu$ M) el radical puede transformarse en peroxinitritos y otras especies reactivas (Stammler, 1994; Butler *et al.*, 1995), capaces de producir cambios estructurales (desaminación) de bases del DNA (Wink *et al.*, 1991 y 1996; Fehsel *et al.*, 1993; Wink & Laval, 1994), alterar de forma directa la actividad enzimática de metaloproteínas (Kown *et al.*, 1994; Hausladen & Fridovich, 1994; Castro *et al.*, 1994) inducir peroxidación de lípidos de membrana (Rubbo *et al.*, 1994), controlar la transcripción de genes específicos (Peunova & Enikolopov, 1993), la traslación de mRNA a proteína (Weiss *et al.*, 1993) o inducir la modificación post-traslacional de las mismas vía ADP-ribosilación (Brüne *et al.*, 1994) o modificando restos de tirosina (Prutz *et al.*, 1993) o cisteína (Radi *et al.*, 1994; Richter *et al.*, 1995),

**1.4. La biogénesis del NO en las células de mamífero se debe a una familia de enzimas específica de tejido y regulada de forma diferenciada.** Los primeros estudios desarrollados para desvelar el mecanismo de generación de NO en células de mamífero demostraron que la reacción dependía de la existencia de arginina extracelular (Hibbs *et al.*, 1977; Stuhler & Marletta, 1985; Palmer *et al.*, 1988). Este hecho permitió diseñar análogos no metabolizables del sustrato (*N*-monometil-L-arginina: L-NMMA; *N*-nitro-L-arginina: L-NNA; *N*-nitro-L-arginina-metil ester: L-NAME) capaces de inhibir el sistema generador de NO y de antagonizar los efectos fisiológicos que implicaban al EDRF (Hibbs *et al.*, 1987; Aisaka *et al.*, 1989; Ress *et al.*, 1989; Vargas *et al.*, 1991).

Pero al demostrarse que la generación de NO depende de la arginina en el medio

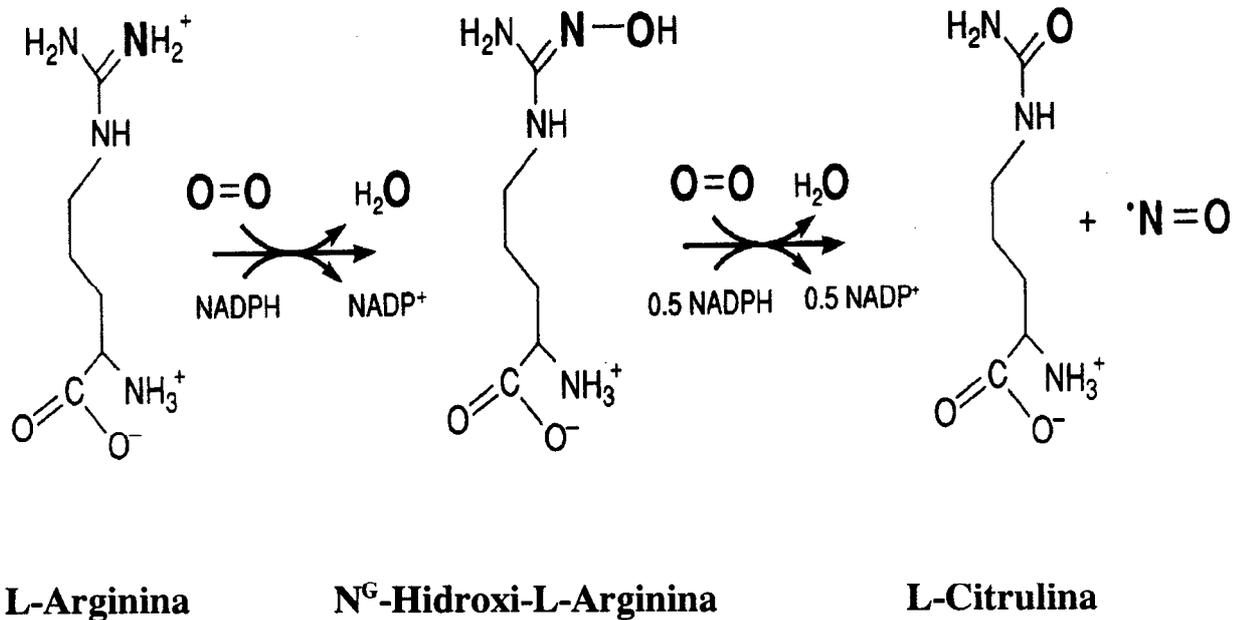
extracelular, se sentaron también las bases para el desarrollo del primer método radioenzimático que permitía determinar la actividad del enzima responsable de su síntesis (NOS: óxido nítrico sintasas; EC 1.14.23.-), demostrar la amplia distribución tisular de estos enzimas (Nathan 1992) y, finalmente, comprobar que la formación del radical libre implica la conversión del sustrato [ $^3\text{H}$ ]arginina en [ $^3\text{H}$ ]citrulina (Palmer & Moncada, 1989; Bredt & Snyder, 1990).

Aunque el mecanismo de reacción de la NOS sigue siendo controvertido, hoy se admite que todas las formas del enzima caracterizadas hasta el momento (**Figura 1.2**) generan NO a partir del grupo guanidinio terminal de la arginina por una reacción de oxidación en la que participan 5 electrones y oxígeno molecular en la que posiblemente se forme también una molécula de agua (Marletta, 1993; Klatt *et al.*, 1992).

La puesta a punto del ensayo radioenzimático permitió no solo postular el mecanismo de esta reacción, sino también determinar mas adelante que la actividad catalítica óptima de todos los enzimas generadores de NO depende de la presencia simultánea en la mezcla de ensayo del cofactor  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (Tayeh & Marletta, 1989; Bredt & Snyder, 1990; Mayer *et al.*, 1990) y de los coenzimas NADPH, FAD y FMN (Mayer *et al.*, 1990 y 1991; Stuehr *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1992; Pollock *et al.*, 1993). Además y como puede apreciarse (**Figura 1.3** y **Figura 1.4**) la reacción necesita la presencia no estequiométrica de tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) que no se consume durante la reacción (Hevel & Marletta, 1992; Werner-Felmeyer *et al.*, 1990 y 1993). Estos factores participan junto al grupo  $\text{Fe}^{2+}$ -porfirina asociado a todas las isoformas de NOS en la reacción oxidativa (White & Marletta, 1992; Klatt *et al.*, 1992; McMillan *et al.*, 1992), y su necesidad *in vivo* también ha sido demostrada (Stuehr, 1997).

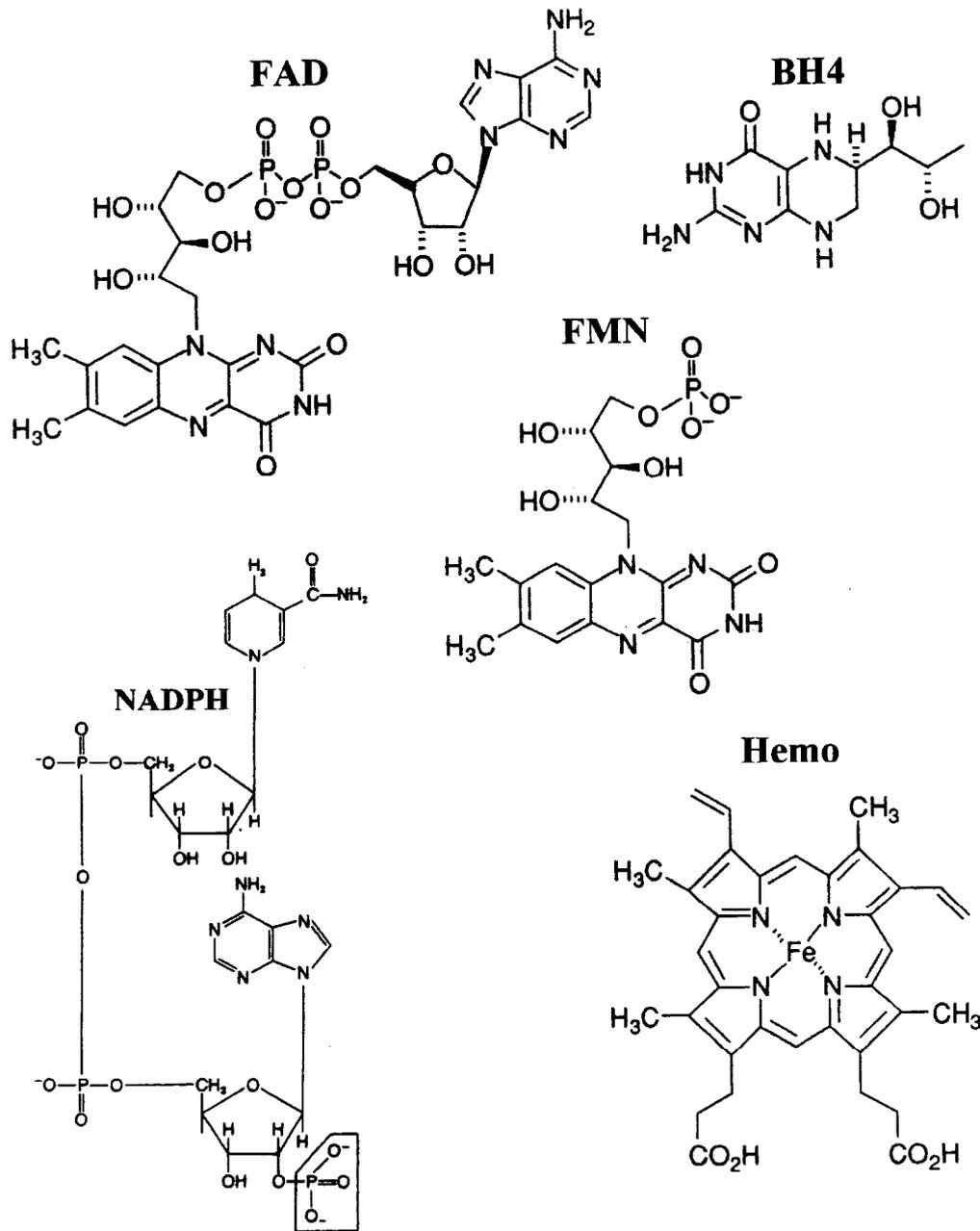
La caracterización molecular y secuenciación de los cDNA correspondientes a las distintas isoformas de NOS (ver apartado siguiente) permitió adjudicar a este tipo de enzimas un lugar de unión para cada coenzima/cofactor (incluido el lugar  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina) que conforman una estructura de mini-cadena transportadora de electrones tal y como se representa

Figura 1.2. Reacción de oxidación de la L-arginina por la NOS y consecuente síntesis de óxido nítrico.



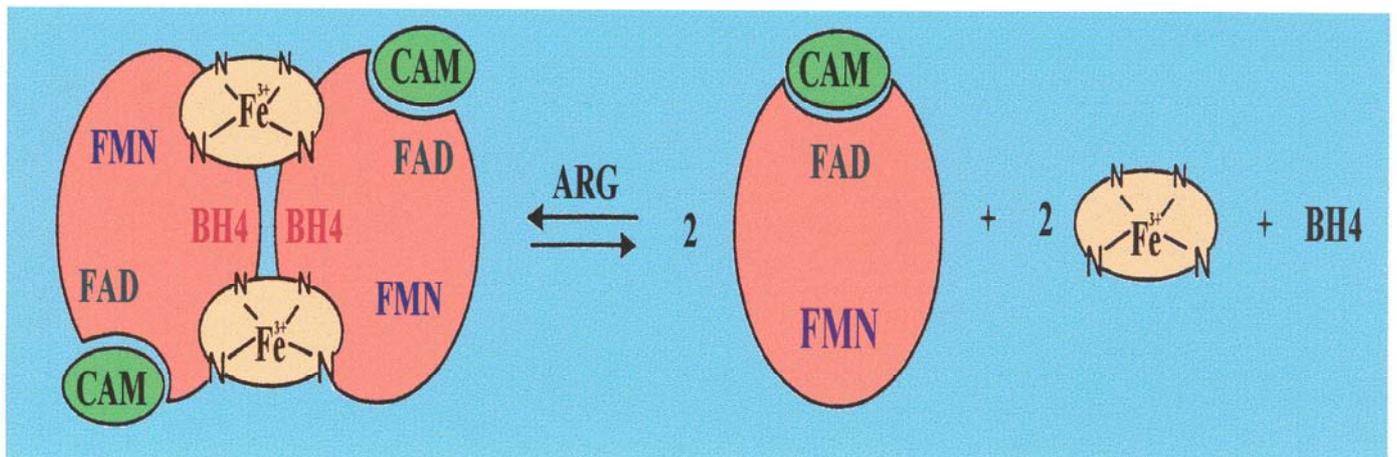
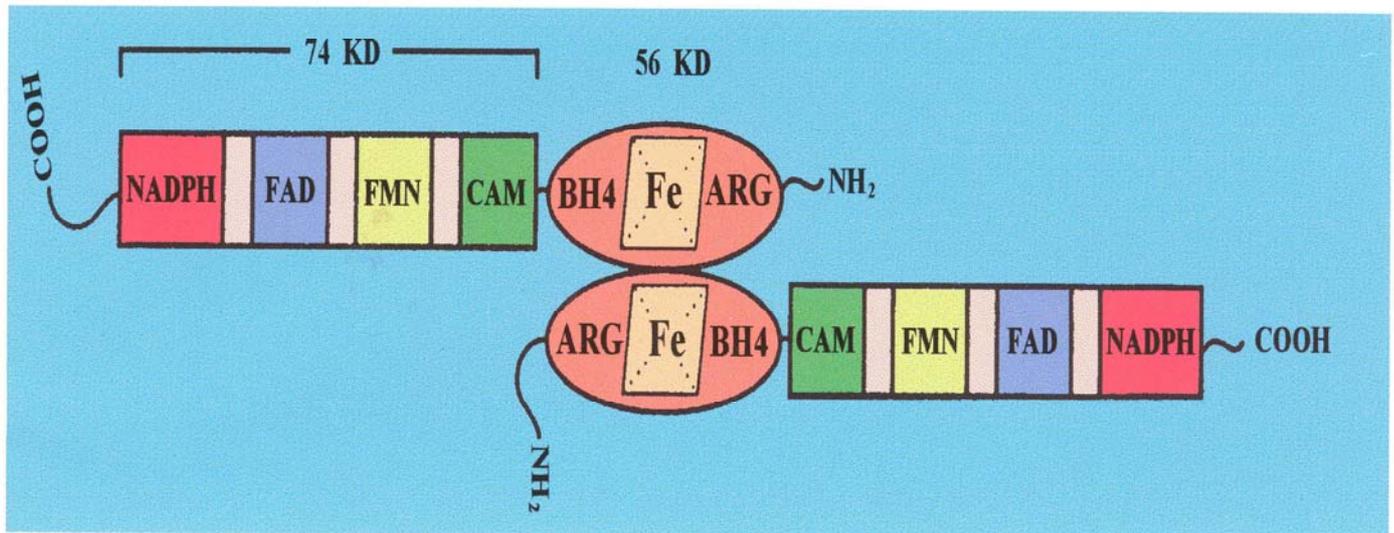
La generación de óxido nítrico por la NOS es debida a la oxidación, dependiente de NADPH, del grupo guanidino terminal de la L-arginina por el enzima. Durante el curso secuencial de dos pasos de oxidación, la L-arginina es primero hidroxilada a N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina que queda unido al enzima para sufrir una lisis oxidativa a L-citrulina y NO. El conjunto de la reacción necesita de la reducción de dos moléculas de oxígeno, lo cual requiere un total de ocho electrones. Cinco de ellos derivan de la oxidación del nitrógeno del grupo guanidino y la co-oxidación del NADPH proporciona los tres electrones adicionales (Feldman *et al*, 1993; Klatt *et al*, 1993; Marletta *et al*, 1993)

Figura 1.3. Coenzimas utilizados por la NOS.



Grupos prostéticos de la NOS: FAD (flavín-adenina dinucleótido), BH4 (tetrahidrobiopterina), FMN (flavín mononucleótido, Hemo (hierro ptroporfirina IX), NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido).

Figura 1.4. Modelo propuesto para la asociación y disociación de unidades diméricas de NOS.



Al aislar NOS, *in vitro*, el enzima aparece como subunidades independientes, las cuales contienen FAD, FMN y calmodulina (CAM) y la NOS funciona como una reductasa dependiente de NADPH que no sintetiza NO. Sin embargo, en presencia coincidente de L-arginina, BH<sub>4</sub> y una cantidad estequiométrica de Fe<sup>3+</sup> se asocian las subunidades para formar un dímero activo de NOS

en la **Figura 1.4.** (Stuher, 1977).

El primer paso de esta reacción enzimática compleja es la hidroxilación de L-arginina para generar el intermediario *N*<sup>o</sup>-hidroxi-L-arginina (Stuehr *et al.*, 1991; Pufahl *et al.*, 1992). A partir de la primera hidroxilación el mecanismo es menos conocido aunque por analogía con otras reacciones catalizadas por otras P450 oxigenasas, se supone que las flavinas aceptan electrones del NADPH y lo transfieren al grupo Fe<sup>2+</sup>-porfirina que se activa y une al oxígeno para formar finalmente NO (Stuher, 1997).

El papel del BH<sub>4</sub> en la reacción es controvertido, ya que a diferencia de otras reacciones de hidroxilación implicadas en la biosíntesis de neurotransmisores a partir de aminoácidos en las que participa como cofactor (Friedman *et al.*, 1972; Kaufmann, 1986; Duch *et al.*, 1984; Dix & Benkovic, 1988) en la formación de NO no hay consumo neto del cofactor (Hevel & Marletta, 1992; Kauffman, 1993; Pollock *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1994). Aunque el esquema anterior no explica porqué las diferentes isoformas de NOS necesitan de forma no estequiométrica la participación de BH<sub>4</sub> (Stuher, 1997), al demostrarse que la tetrahidrobiopterina copurificaba con diferentes tipos de NOS (Giovanelli *et al.*, 1991; Hevel & Marletta, 1992) se empezó a plantear un papel diferente para este cofactor al que se le atribuye hoy una función estructural fundamental en el mantenimiento de las formas dimericas activas del enzima (Baek *et al.*, 1993; Stuher, 1997).

**1.5. Las isoformas de oxido nítrico sintasa (NOS) como condicionantes del papel regulador del NO.** Por el enorme interés del NO en el control del tono vasodilatador de los endotelios vasculares (Inagami *et al.*, 1995; Umans & Levi, 1995; Cooke *et al.*, 1997) no es extraño que el aislamiento y caracterización de la NOS endotelial fuera el objetivo científico mas apetecible en el campo (Pollock *et al.*, 1991). No obstante, la primera purificación del enzima que se consiguió gracias a la puesta a punto del ensayo radioenzimático descrito, fue la isoforma de cerebro de rata, donde las concentraciones del enzima (particularmente en el cerebelo) son unas 20 veces superior a la que se encuentra en otros tejidos (Bredt & Snyder, 1990).

A partir de estos datos se logra aislar el cDNA correspondiente del enzima (Bredt *et al.*, 1991; Nakane *et al.*, 1993) y posteriormente la caracterización molecular de las otras isoformas (constitutivas e inducibles) del enzima en macrófagos (Lowenstein *et al.*, 1992; Lyons *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1994), hepatocitos (Adachi *et al.*, 1993; Geller *et al.*, 1993), células endoteliales de diferentes especies (Marsden *et al.*, 1992 y 1993; Nishida *et al.*, 1992; Sessa *et al.*, 1993).

**1.6. Clasificación de los diferentes tipos de óxido nítrico sintasa (NOS).** En base a los múltiples efectos del NO endógeno sobre los sistemas biológicos, y la creciente multiplicidad de células y tejidos capaces de generar NO bajo diferentes condiciones fisiológicas y/o experimentales, se han sucedido los intentos por clasificar de forma sistemática los enzimas responsables de la generación del radical libre. La clasificación se ha basado en diferentes criterios que incluye desde los puramente bioquímicos y estructurales iniciales (Fösterman *et al.*, 1991) hasta los más fisiológicos basados en la especificidad tisular, el requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina para una actividad catalítica óptima (Tayeh & Marletta, 1989; Bredt & Snyder, 1990; Stuehr *et al.*, 1990; Mayer *et al.*, 1990) y, más recientemente por la homología de secuencia y la forma en que se regula su expresión (Fösterman *et al.*, 1995).

Aunque todas son proteínas complejas de PM similar (131-160 KDa), que comparten una alta homología de secuencia y solo son activas en su forma homodimérica (Baek *et al.*, 1993; Stuehr, 1977), las diversas isoformas suelen clasificarse en las tres categorías fundamentales: NOS1, NOS2 y NOS3 aunque no se ha logrado un criterio consensuado para la adscripción de las diferentes isoformas de NOS a una familia determinada, y por tanto como se detalla en la **Tabla I** siendo frecuente encontrar diferentes tipos de denominación para la misma forma molecular del enzima. Se incluye por esta razón la equivalencia con las denominaciones más clásicas que atienden al tejido de origen, la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina y/o la forma en que se regula su expresión sigue siendo de uso común (Fösterman *et al.*, 1995).

A título de ejemplo, y aunque para distinguir entre los diferentes tipos de NOS fue

**Tabla I.** *Clasificación de las diferentes enzimas generadoras de NO.*

<i>Clasificación</i>	<i>Descripción</i>	<i>Características de la Isoforma</i>
<b>NOS I</b> (NOS 1)	<b>b-NOS</b> (NOS de cerebro) <b>c-NOS</b> (NOS constitutiva) <b>N-NOS</b> (NOS neuronal)	* Baja actividad. Se expresa de forma constitutiva. Se regula por pequeños aumentos de $[Ca^{2+}]$ intracelular.
<b>NOS II</b> (NOS 2)	<b>e-NOS</b> (NOS endotelial) <b>c-NOS</b> (NOS constitutiva)	* Baja actividad. Se expresa de forma constitutiva. Se regula por pequeños aumentos de $[Ca^{2+}]$ intracelular. Se ancla vía miristoilización a la membrana plasmática.
<b>NOS III</b> (NOS 3)	<b>i-NOS</b> (NOS inducible) <b>mac-NOS</b> (NOS de macrófago) <b>hep-NOS</b> (NOS de hepatocito)	* Alta actividad. Se expresa en respuesta a citoquinas, LPS y otros factores. Su regulación es independiente de $[Ca^{2+}]$ , debido a alta afinidad.

importante clasificar la actividad catalítica de los diferentes enzimas en función de la dependencia (neuronas, endotelios, cerebro) o actividad no dependiente (macrófagos) de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (Tayeh & Marletta, 1989; Bredt & Snyder, 1990; Stuehr *et al.*, 1990; Mayer *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 1992), esta división se demostró mas tarde que era mas formal que real, pues las isoformas inicialmente denominadas independientes del cofactor, son en realidad capaces de unirse al mismo a las bajas concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina presente en las células en reposo (Abu-Soud & Stuehr, 1993).

Al grupo de isoenzimas NOS1 se adscriben las formas inicialmente caracterizadas en cerebro de diferentes especies (Bredt & Snyder, 1990; Mayer *et al.*, 1990; Schmit *et al.*, 1991) por ello también denominadas en la literatura como bNOS (brain NOS) y nNOS (neuronal NOS) que hace referencia a su localización en neuronas nitrérgicas periféricas (Sheng *et al.*, 1992). Las NOS incluidas en este grupo se expresan constitutivamente en los correspondientes tejidos y se denominan por tanto cNOS, y se caracterizan por generar de forma transitoria cantidades nanomolares de NO en respuesta a agentes que aumentan los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, por lo que se las clasificó como isoformas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (Bredt & Snyder, 1990; Fösterman *et al.*, 1990). A este grupo con el que comparten muchas de sus características, suelen asociarse además los enzimas caracterizado en adrenales (Dun *et al.*, 1993), células epiteliales de pulmón (Asano *et al.*, 1994), islotes del pancreas (Schmidt *et al.*, 1992) y músculo esquelético humano (Nakane *et al.*, 1993).

El grupo NOS2 está funcionalmente relacionado con el NOS1 en lo que a expresión constitutiva y el modo en que generan pequeños pulsos de NO en respuesta a agentes que elevan el calcio intracelular, y forman parte de este grupo los enzimas endoteliales (eNOS) bovino (Pollock *et al.*, 1991; Sessa *et al.*, 1992; Lamas *et al.*, 1992; Nishida *et al.*, 1992) y humano (Janssens *et al.*, 1992, Marsden *et al.*, 1992). No obstante, se diferencian del grupo anterior porque los enzimas NOS2 se miristoilizan de forma posttraslacional, fenómeno que permite su anclaje y localización en la fracción particulada de membranas (Fösterman *et al.*, 1991a y 1991b; Plock *et al.*, 1991).

Los enzimas del grupo NOS3 se aislaron de macrófagos (mNOS) de ratón (Hevel *et al.*, 1991; Yui *et al.*, 1991; Lowenstein *et al.*, 1992). Los estudios realizados para la caracterización de esta isoforma demostraron que la proteína no se expresa en células no estimuladas, aunque su síntesis *de novo* aumenta, para generar grandes cantidades de NO, en respuesta a endotoxina bacteriana (LPS), citoquinas (entre las que inicialmente se identificarían el IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ ) o combinaciones (citomix) de estos agentes (Lui *et al.*, 1993; Nüssler *et al.*, 1992). Al ser la actividad de esta isoforma dependiente de la transcripción de su mRNA y su traslación a proteína, pasaron a denominarse formas inducibles (iNOS). Pero al tener las formas moleculares de este grupo la capacidad de unir Ca<sup>2+</sup>/calmodulina a las bajas concentraciones de la célula en reposo (Cho *et al.*, 1992), se denominan frecuentemente formas independientes del cofactor (Fösterman, 1991).

Aunque inicialmente caracterizadas en macrófagos, también se adjudican a este grupo NOS2 las formas moleculares hepNOS aislada de hepatocitos (Geller *et al.*, 1992; Wood *et al.*, 1993; Adachi *et al.*, 1993), músculo liso (Nunokawa *et al.*, 1993), condrocitos articulares (Charles *et al.*, 1993; Meier *et al.*, 1993) y otras células normales (Myatt *et al.*, 1993; Sherman *et al.*, 1993) y transformadas de diferentes especies (Lyons *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1992; Sherman *et al.*, 1993).

**1.7. Regulación endocrina, paracrina y autocrina del desarrollo y atresia del folículo ovárico: participación de la célula granulosa en el proceso.** En las hembras de mamífero, la función reproductora es un proceso cíclico que comprende las fases de iniciación y crecimiento de una cohorte de folículos seguido de la selección y maduración de uno (o más dependiendo de la especie) folículos(s) destinados a ovular. El ciclo culmina con la ruptura de la pared folicular y liberación de uno o más óvulos, proceso que comparte los mecanismos biofísico y bioquímicos típicos de un proceso inflamatorio típico (Hunzicker-Dun & Birnbaumer, 1976; Espey, 1980; Richards, 1980; Hunter & Poyster, 1985) y se cierra con la formación posterior del cuerpo lúteo capaz de mantener el embarazo (Dizerega & Hodgen, 1981; Richards *et al.*, 1987; Greenwald & Terranova, 1988; Richards, 1994).

Experimentos fisiológicos clásicos ya habían permitido determinar la importancia de los niveles de FSH y LH para mantener el crecimiento folicular hasta la fase de folículo preantral pequeño (Richards, 1980; Richards *et al.*, 1987), y también que los aumentos de gonadotropinas circulantes eran necesarios para la formación del folículo preovulatorio capaz de producir los estrógenos circulantes que actúan sobre la hipófisis para desencadenar el pico secretorio de gonadotropinas que precede a la ovulación (Espey, 1970; Dizerega & Hodgen, 1981; Wallach *et al.*, 1989).

Este paradigma endocrino clásico y vigente durante muchos años, que atribuye a las gonadotropinas hipofisaria (FSH y LH) un papel director del proceso reproductor, permitió formular los mecanismos básicos de funcionamiento y control del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal (Hsueh *et al.*, 1994). Sin embargo, este modelo no explica muchas cuestiones determinantes del proceso, que hoy se conocen con mayor profundidad, entre las que se incluye el porqué bajo situaciones de estimulación gonadotropa uniforme, solo un número determinado de folículos inician el proceso de desarrollo y que solo uno (o algunos según la especie) llegue a convertirse en folículo(s) dominantes capaces de culminar el proceso y producir un gameto maduro (Udoff & Adashi, 1996).

En efecto y a pesar de la uniformidad del perfil cíclico de secreción de hormonas hipofisarias (FSH y LH) y gonadales (estrógenos y progesterona), el número de óvulos al inicio de la pubertad en los mamíferos oscila entre  $10^5$  y  $4 \times 10^5$  (según la especie), pero sólo una ínfima proporción que oscila entre el 0.1% (humanos) y 30% (roedores) llegarán durante toda la vida reproductiva a producir un óvulo maduro (Byskov, 1978). El resto de los folículos (mas del 99% en humanos) sufrirá un proceso degenerativo conocido como atresia folicular (Baker, 1963), que hoy se sabe que implica fundamentalmente la apoptosis de las células granulosa del folículo (Hsueh *et al.*, 1994; Kaipia & Hsueh, 1997). Puede asegurarse por tanto que la atresia/apoptosis folicular es mas la norma y destino del potencial reproductor de la hembra de una especie dada, y que el éxito que culmina la función fisiológica del ovario es un evento excepcional (Baker, 1963; Hsueh *et al.*, 1994; Kaipia & Hsueh, 1997).

Esta paradoja llevó, primero a postular la necesidad de otros mecanismos y estímulos locales para crear el ambiente hormonal necesario para el desarrollo y maduración del folículo (Richards, 1980; Richards, 1994) y, mas tarde, a la búsqueda de más información que permitió identificar otras señales endocrinas, paracrinas y/o autocrinas capaces de proporcionar un ajuste local (intraovárico) fino a la acción de la FSH y LH en el proceso de maduración folicular (Kaipia & Hsueh, 1997).

Aunque la información sobre las señales que inician el crecimiento folicular es escasa, se sabe que una vez en marcha el proceso de crecimiento simultaneo de una cohorte de folículos, la selección final tiene lugar por un mecanismo inseparable del éxito de otro proceso: el de proliferación, diferenciación y adquisición del fenotipo esteroideogénico típico de la célula granulosa (CGO) contenida en el interior del folículo ovárico (Hsueh *et al.*, 1984; Richards *et al.*, 1987; Tonetta & Dizerega, 1989; Adashi, 1990).

A pesar de que las evidencias experimentales acumuladas *in vivo* e *in vitro* indican que este proceso depende de los estímulos endocrinos inducidos por FSH y LH y mediados por receptores de 7 dominios transmembranales acoplados vía proteína G a adenilato ciclasa (McFarland *et al.*, 1989; Minegish, 1990 y 1991; Wang *et al.*, 1991 y 1992; Heckert *et al.*, 1992; Kentol *et al.*, 1992; Segaloff & Ascoli, 1993), se sabe también que la proliferación y diferenciación de estas células necesita de un adecuado y delicado equilibrio entre gonadotropinas y otras señales moduladoras de origen endocrino, paracrino o autocrino (Yoshimura & Wallach, 1987; Richards, 1994; Richards *et al.*, 1995).

Usando células en cultivo primario o folículos preovulatorios aislados de ratas inmaduras tratadas con PMSG se ha podido demostrar que los propios estrógenos del ovario (Billig *et al.*, 1993 y 1994) las gonadotropinas (FSH y LH) e IGF-I (Shun *et al.*, 1994; Tilly *et al.*, 1995) o el EGF/TGF $\alpha$  y bFGF (Tilly *et al.*, 1992a y 1992b) previenen el fenómeno de muerte espontánea de las CGO foliculares, de tal forma que estos resultados comienzan a definir en términos celulares y moleculares un sistema de control para el crecimiento y/o el proceso de atresia folicular (Hsueh *et al.*, 1994),

**1.8. Papel de las citoquinas IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y NO en la regulación de la función de la célula granulosa y en la maduración y la atresia del folículo ovárico.** Entre los factores que modulan el desarrollo folicular se encuentran (entre otras) las citoquinas IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , cuyo origen más probable en la gónada sean los macrófagos residentes del ovario (Adashi, 1989 y 1990; Adashi & Richard, 1991; Simon *et al.*, 1996; Heller & Krönke, 1994). Aunque las dos citoquinas son proteínas de 17 kDa inmunológicamente diferentes con frecuencia ambas inducen respuestas biológicas similares en células inmuno- y no inmunocompetentes (Dinarello, 1988 y 1989; Vilcek & Lee, 1991) y ello a pesar de que sus receptores (pp80 y pp60) de IL1 $\beta$  (Calotta *et al.*, 1993; Sims *et al.*, 1993) y los pp80 y pp55 del TNF $\alpha$  (Loetscher *et al.*, 1990) no guardan homología de secuencia entre sí.

En el ovario el TNF $\alpha$  (Emoto & Baird, 1988; Roby & Terranova, 1988 y 1990; Adashi *et al.*, 1989; Darbon *et al.*, 1989; Fukuoka *et al.*, 1988, 1989 y 1993) y la IL1 $\beta$  (Gottshal *et al.*, 1988a y 1988b y 1989; Hurwitz *et al.*, 1992a y 1992b) inhiben la esteroidogénesis en CGO estimuladas con FSH y se ha postulado, por tanto, su participación general en los procesos inhibitorios que incluyen a la atresia folicular (Adashi *et al.*, 1989 y 1990). Sin embargo la concentración de ambas citoquinas aumentan en el líquido folicular durante el pico de LH que precede a la ovulación (Simón *et al.*, 1994) por lo que también se ha propuesto un papel mediador para las citoquinas en el proceso proinflamatorio de ruptura del folículo y liberación del óvulo maduro (Adashi, 1989 y 1990 Tsafiriri *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1997).

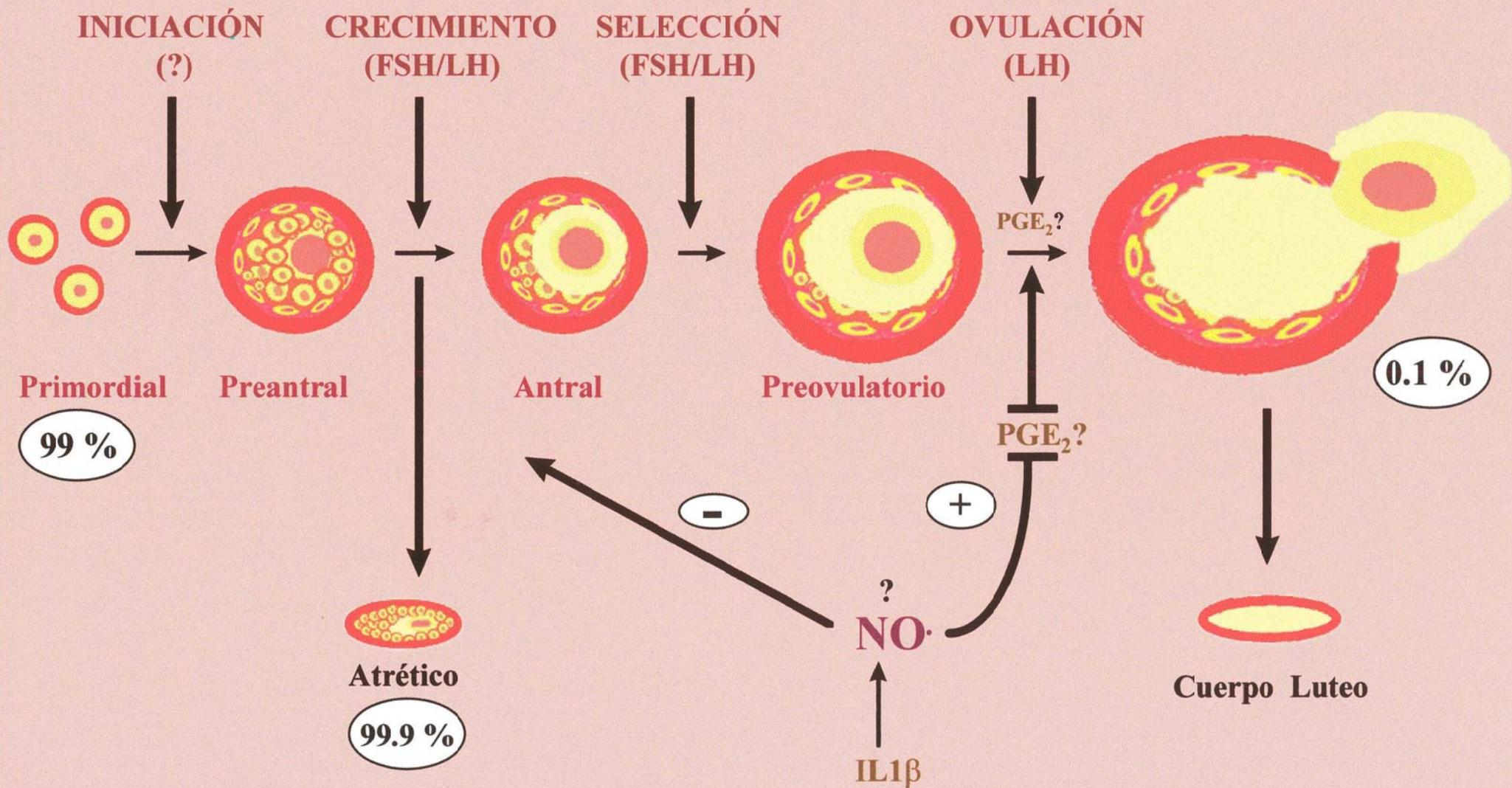
En célula granulosa, el tratamiento con IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  activan el nuevo sistema de segundos mensajeros que se inicia con la hidrólisis de esfingomielina (Kolesnick, 1992; Hannun & Linaudic, 1993; Hannun, 1994), y la generación de ceramida aparece como el segundo mensajero implicado en los efectos inhibitorios de ambas citoquinas sobre la diferenciación inducida por FSH a célula productora de esteroides (Santana *et al.*, 1995 y 1996). No obstante, la activación de la vía de la esfingomielina es un factor generalmente asociado a la inhibición del crecimiento celular y a la inducción de apoptosis (Kolesnick, 1992; Hannun & Linaudic, 1993; Hannun, 1994) y aunque la ceramida mimetiza los efectos

del  $TNF\alpha$  induciendo apoptosis de los folículos ováricos (Kaipia *et al.*, 1996; Witty *et al.*, 1996; Nahum *et al.*, 1996), la  $IL1\beta$  en cambio previene eficazmente este fenómeno por un mecanismo que implica la generación de NO (Chun *et al.*, 1995).

Aparte de la demostración relativamente reciente de la capacidad del NO para prevenir la apoptosis espontánea en folículos preovulatorios de rata (Chun *et al.*, 1995) otras evidencias experimentales anteriores ya habían planteado un papel relevante para el NO como regulador de la función ovárica, que incluyen la habilidad de los inhibidores de la NOS para bloquear la ovulación en ratas inmaduras tratadas con hCG (Shukowski & Tsafiri, 1994), y la capacidad de la  $IL1\beta$  para inducir la acumulación de nitritos en células ováricas totales (obtenidas por dispersión con colagenasa y cultivadas en medio libre de suero) de una forma dependiente del tiempo (Elfman *et al.*, 1993; Adashi *et al.*, 1994) y compatible con la aparición de una forma inducible (iNOS) de la óxido nítrico sintasa.

Por la similitud entre el proceso ovulatorio y un proceso inflamatorio clásico (Espey, 1980) unido a la habilidad de la  $IL1\beta$  para estimular la producción de NO en el ovario (Elfman *et al.*, 1993; Adashi *et al.*, 1994; Chun *et al.*, 1995) el objetivo general de la presente memoria ha sido investigar de forma más precisa los mecanismos de control de la generación de NO en el ovario, y estudiar en qué forma se interrelacionan diferentes hormonas y sistemas de segundos mensajeros para regular la expresión de iNOS en célula granulosa mantenida en cultivo.

# CRECIMIENTO Y DESARROLLO FOLICULAR



# MATERIAL Y MÉTODOS

## 2.1. Productos utilizados

**2.1.1. Precursores radioactivos.** Para los radioinmunoensayos descritos en esta memoria se usaron los trazadores [1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)]progesterona (92 Ci/mmol) y [5,6,8,11,12,14,15-<sup>3</sup>H(N)]prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) que se obtuvieron de Du Pont-New England Nuclear (Bad Homburg, Alemania). En las técnicas radioenzimáticas se usaron los compuestos [1β,2β-<sup>3</sup>H(N)]androst-4-ene-3,17-diona (45,3 Ci/mmol), L-[2,3-<sup>3</sup>H]arginina (35.7 Ci/mmol) y L-[<sup>14</sup>C-U]citrulina (58.8 mCi/mmol) obtenidos de la misma fuente comercial.

Antes de usar los esteroides radiactivos se purificaron por cromatografía en capa fina (CCF), con dos recorridos sucesivos en el sistema cloroformo/éter (5:1, v/v). De acuerdo a las recomendaciones del fabricante, la [<sup>3</sup>H]arginina usada como sustrato radioactivo de la NOS, se purificó por cromatografía en columna inmediatamente antes de cada experimento usando una resina de intercambio catiónico Dowex H<sup>+</sup>-AG 50W-X8, 100-200 mesh (BIORAD, Madrid) tal y como se describirá en el apartado correspondiente (Bredt & Snyder, 1989, Durante *et al.*, 1995).

**2.1.2. Hormonas, factores de crecimiento y otros tratamientos.** La FSH porcina (75 U NIH-S1) y la gonadotropina coriónica humana (hCG, CR-121) usada en experimentos con células MA-10 fueron generosamente donadas por la National Hormone and pituitary Agency (Baltimore, MD). La interleukina-1β (IL1β), la proteína antagonista del receptor de interleukina (ILRA), el factor necrótico tumoral α (TNFα) y el interferón γ (IFNγ), se obtuvieron de Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim, Alemania). El lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS), el análogo permeable (but<sub>2</sub>-)cAMP, dietilestilbestrol (DES), prostaglandina E<sub>2</sub>, androstendiona y progesterona se obtuvieron de Sigma Chemical Co., (St Louis, MO, USA).

Los esteroides no radioactivos se purificaron antes de usar por recristalización a partir de una solución saturada y caliente en etanol absoluto. Las ceramidas permeables *N*-acetil esfingosina (C<sub>2</sub>-Cer) y *N*-hexanoilceramida (C<sub>6</sub>-Cer) se obtuvieron de BIOMOL

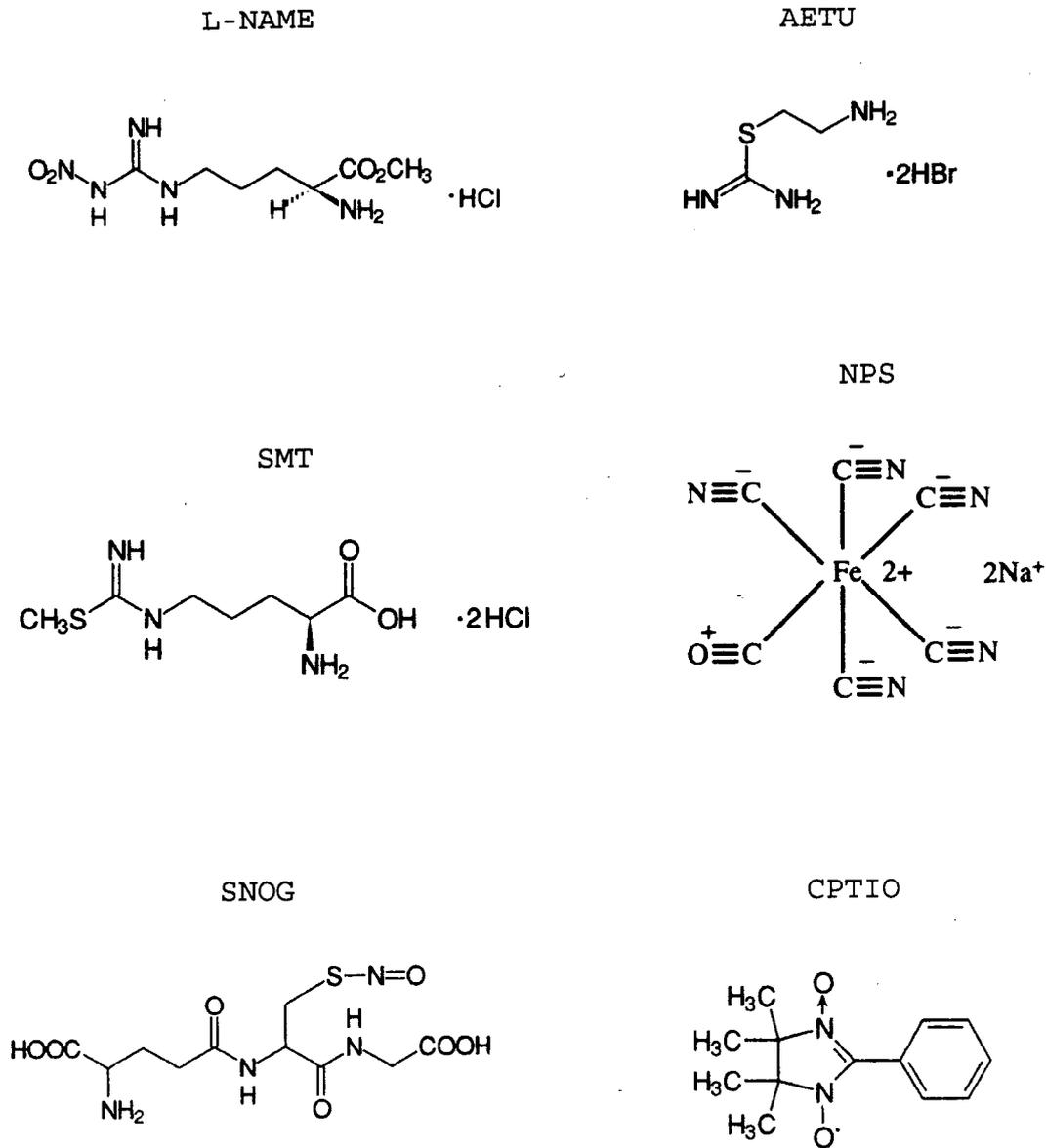
(Plymouth Meeting, PA, USA).

**2.1.3. Agentes farmacológicos utilizados en el estudio de la actividad de la oxido nítrico sintasa (NOS) y de las vías "de novo" y salvamento implicadas en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina (BH4).** Para investigar la actividad NOS, y su relación con otros parámetros bioquímicos en célula granulosa ovárica se utilizaron los agentes específicos cuya estructura química y nombre sistemático se representan en la **Figura 2.1**.

El análogo de la arginina L-NAME que actúa como inhibidor competitivo y no selectivo de todas las isoformas de NOS (Dawson *et al.*, 1991) y su enantiómero inactivo D-NAME (Li *et al.*, 1994), se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). El AETU, que inhibe potentemente y de forma selectiva las formas inducibles (iNOS) del enzima (Southan *et al.*, 1995) y el SMT que actúa como inhibidor no selectivo de todas las isoformas de NOS (Furfin *et al.*, 1994) se obtuvieron de Calbiochem Corp. (La Jolla, CA, USA). De la misma casa comercial y como donantes de NO obtuvimos el NPS (Kowaluk *et al.*, 1992) y el SNOG (Radomski *et al.*, 1992); mientras que como rastrillo (scavenger) del radical libre usamos el CPTIO un compuesto que según la bibliografía capta NO y lo convierte en las especies oxidadas  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  (Amano *et al.*, 1995), pero que en nuestras manos y usando dos líneas celulares diferentes (célula granulosa ovárica y macrófagos J774) actúa como un potente inhibidor de la iNOS. Por otra parte, para estudiar los efectos del NO sobre el enzima guanilato ciclasa, se usaron el azul de metileno (AM), que actúa como secuestrador de NO y/o inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (Mayer *et al.*, 1993), el compuesto LY-83,583, inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (Beasley *et al.*, 1991), y el análogo permeable del producto del enzima (cGMP)  $\text{but}_2\text{cGMP}$  (Sane *et al.*, 1989).

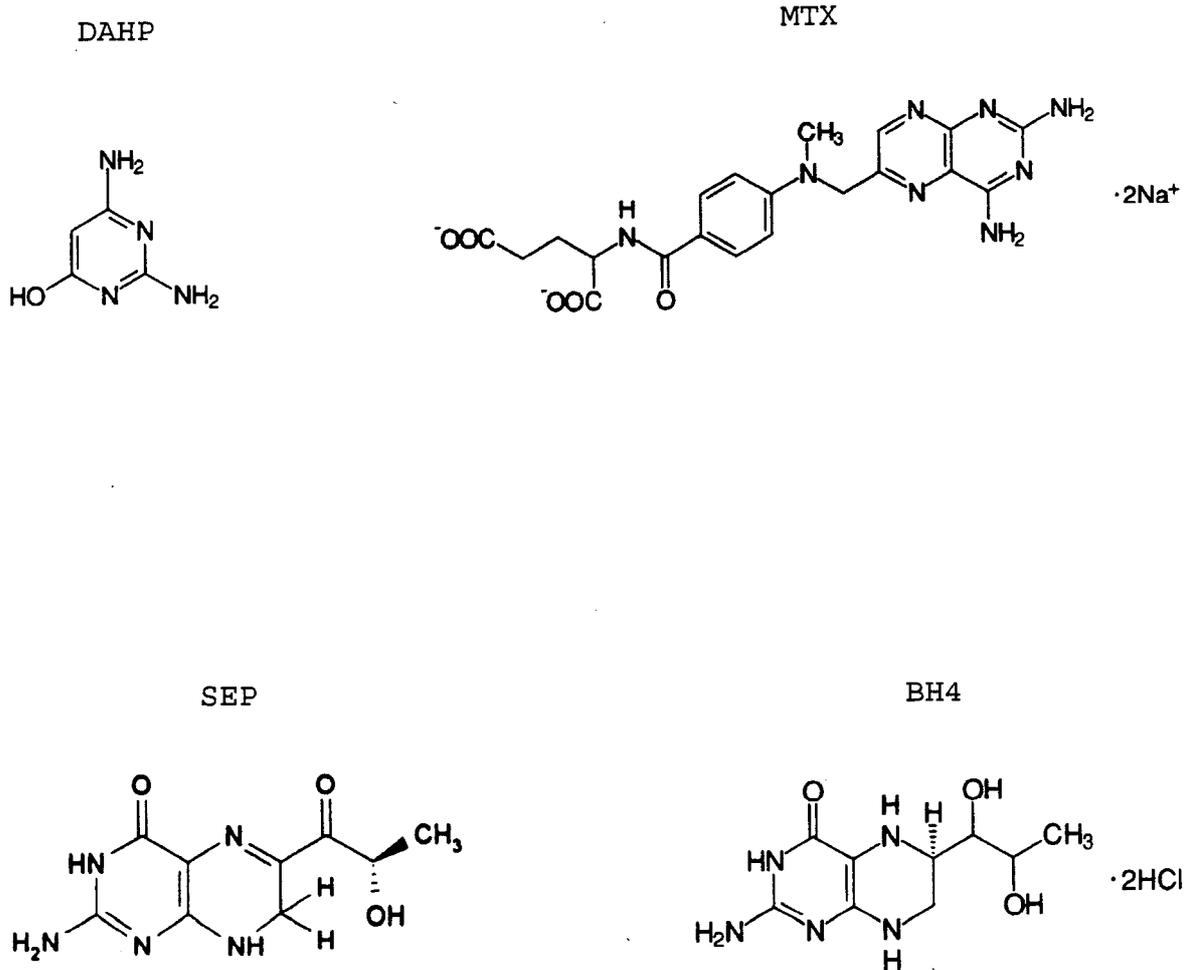
Para investigar el papel general de las vías "de novo" y salvamento en la biosíntesis de BH4 y su relación con otras respuestas celulares en CGO, se utilizaron los agentes que se representan junto a sus formulas y nomenclatura sistemática en la **Figura 2.2**. Se usó el DAHP para inhibir la GTPCH de la vía "de novo" (Gross & Levi., 1992), el metotrexato (MTX) para inhibir la Dihidrofolato reductasa (DHFR) de la vía de salvamento (Kaufman

**Figura 2.1. Agentes farmacológicos usados para investigar la vía del óxido nítrico en esta memoria.**



N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil ester: **L-NAME**; Inhibidor competitivo de la NOS  
 2-(2-aminoetil)2-tio-pseudourea: **AETU**; Potente y selectivo inhibidor de iNOS.  
 S-metil-L-tiocitrulina.2HCl: **SMT**; Potente inhibidor de NOS.  
 S-Nitrosoglutatión: **SNOG**; Donante de NO, relajante de la musculatura lisa.  
 Nitroprusiato sódico: **NPS**; Donante de NO con efectos vasodilatadores.  
 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido: **CPTIO**; Secuestrador de NO.

**Figura 2.2. Inhibidores y precursores de la biosíntesis de la tetrahidrobiopterina utilizados en esta memoria.**



2,4-diamino-6-hidroxi-pirimidina: **DAHP**; Inhibidor específico de la GTPCH.

Metotrexato: **MTX**; Inhibidor de la Dihidrofolato reductasa (DHFR).

L-sepiapterina: **SEP**; Precursor de la 7,8-dihidro-L-biopterina (BH2) por la vía de salvamento

(6R)-5,6,7,8-tetrahidro-biopterina: **BH4**; Producto final de las vías *de novo* y *salvamento*.

*et al.*, 1986 y 1993) y la L-sepiapterina (SEP) como precursor del BH<sub>4</sub> en la vía de salvamento (Gross & Levi., 1992).

El producto final, BH<sub>4</sub>, de ambas vías y los compuestos dihidroneopterina, biopterina y pterina que se usaron como patrones para la identificación y cuantificación intra- y extracelular de los mismos en las técnicas de HPLC (ver más adelante sección 3.3.5.) se obtuvieron todos de Dr. Schricks Laboratories (Jona, Suiza).

**2.1.4. Productos y material para los cultivos celulares.** La L-glutamina, HEPES (N-[2 hidroxietil] piperazino N'-[2 etano sulfanílico), gentamicina, bicarbonato sódico y antibióticos (estreptomina y penicilina) se obtuvieron de Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo). La tinción de azul de tripán, y los medio de cultivo McCoy's 5a (modificado, sin suero), Waymouth MB752/1 y DMEM fueron adquiridos a Gibco BRL (Gaithersburg, CA). El suero de caballo (para el cultivo de células MA-10) y el suero de ternera fetal (FCS) para los cultivos de macrófagos J774 se obtuvieron de Biowhittaker (Walkersville, USA). Las placas de cultivo estériles individuales (35 mm) o de 24 pocillos (Falcon) se adquirieron de Becton & Dickinson, (Lincoln Park, NJ). Los Filtros de 0.2 μm se obtuvieron de Millipore Ibérica SA, (Madrid, España).

**2.1.5. Productos y material cromatográfico y de electroforesis.** Los patrones de pesos moleculares preteñidos, acrilamida, bis N,N'-metilene-bis-acrilamida, persulfato amónico, N,N,N,N'-tetrametil-etilenediamina (TEMED), dodecil sulfato sódico (SDS), tritón X-100, agarosa, azul de bromofenol, β-mercaptoetanol, deoxicolato sódico, y los inhibidores de proteasas (pepstatina A, aprotinina, leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo y iodoacetamida) se obtuvieron todos de Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo). Los anticuerpos usados en las técnicas de western-blott (anti-iNOS y anti-COX2) fueron adquiridos a Transduction Laboratories, KE, USA.

**2.1.6. Otros productos de laboratorio.** El agua desionizada y bidestilada se obtuvo con un equipo Mili-Q (Water Purification System, Millipore Ibérica SA, Madrid, España).

El EDTA, NaCl, NaOH, HCl, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, trizma base, trizma-HCl, azida sódica, gelatina (75 bloom de piel de ternera), nitrito y nitrato sódico, sulfanilamida, hidrocloreuro de naftil-etilendiamina, bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazolil-2)2,5-difeniltetrazolio, sulfato cúprico pentahidratado, ácido bicinconínico y otros productos utilizados en la preparación de reactivos y tampones se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El resto de los productos usados en la presente memoria fueron de la mejor calidad analítica que ofrece el mercado (BDH, Carlo Erba, E. Merck y Fluka).

**2.1.7. Productos de biología molecular usados en la técnicas de RT-PCR.** Para la extracción de RNA se usaron reactivos preparados Ultraspec™ RNA de Biotecx (Houston, TX). Los pd(T) y dNTPs se obtuvieron de Pharmacia Biotech (Barcelona). La AMV-transcriptasa inversa, RNasin y Taq DNA polimerasa fueron suministrados por Promega (Madison, WI). El Dig-11-deoxiuridin trifosfato (Dig-11-dUTP), las membranas de nylon positivamente cargadas y el kit de detección por quimioluminiscencia (Dig Luminiscent Detection Kit no. 1363-514), se adquirieron a Boehringer Mannheim (Barcelona). Los cebadores (primers) con las secuencias que se especifican en la **TABLA II** fueron sintetizados por encargo (DNA International, Muskego, OR), y se utilizaron tal y como se detallará en los apartados correspondientes. En todos los casos en que se estudió la expresión de genes específicos en CGO, se usó como control interno de amplificación la proteína ribosomal L-19, ya que sus niveles no se modifican en estas células bajo diferentes manipulaciones experimentales (Orly *et al.*, 1994; Santana *et al.*, 1996). En los experimentos preliminares usando células MA-10 y J774, se amplificó la G3PDH utilizando cebadores específicos comerciales (Clontech, PA, USA). Todos los cebadores (21-25 nucleótidos; contenido medio GC 45-60 %) se recibieron liofilizados y se disolvieron en H<sub>2</sub>O/DEPC (1,000 pmol/ $\mu$ l) y almacenaron (-70°C) nada mas llegar, manteniendose las soluciones de trabajo (30 pmol/ $\mu$ l en H<sub>2</sub>O/DEPC) a 4°C durante el período de utilización.

## **2.2. Modelos Experimentales**

**2.2.1. Cultivo primario de células granulosa.** Para los cultivos de CGO, se utilizaron

ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley paridas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. La colonia deriva de hembras preñadas consanguíneas adquiridas a Lettica SA (Barcelona, España). Los animales se mantuvieron en jaulas transparentes en condiciones de estabulación óptimas, a temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C) e iluminación (ciclo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad) constante, con libre acceso al agua de bebida y a una dieta estándar de laboratorio (Biona, Las Palmas, España).

A los 22 días de edad las hembras se destetaron e inyectaron durante 5 días con DES (1 mg/60 $\mu$ l/día en solución oleosa s.c.) para inducir la proliferación de una población homogénea de células granulosa, realizándose a continuación las manipulaciones que se esquematizan en la **Figura 2.3**, y que describimos a continuación.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical en el cuarto de cirugía y los ovarios se extrajeron en condiciones de máxima esterilidad por aproximación retroperitoneal, no empleándose durante el sacrificio y extracción de los ovarios más de 2-3 minutos/rata. Los ovarios se lavaron en el cuarto de cultivo bajo una campana de flujo laminar por 4-5 pases sucesivos en placas de cultivo estériles conteniendo medio McCoy's 5a modificado, suplementado con HEPES (20 mM), L-glutamina (2mM) y antibióticos (penicilina/estreptomicina 1U/ml y 1 $\mu$ g/ml respectivamente). El parénquima ovárico se separó de la cubierta grasa periovárica y de los restos de trompa unidos al hilio bajo una lupa binocular, y las células se obtuvieron por punción cuidadosa de los folículos con agujas de insulina estériles (27x 1/2") para hacer fluir de esta forma a las células contenidas en los folículos al medio de cultivo.

Las células terminaron de disociarse por aspiración repetida del medio con pipetas plásticas estériles, de calibre decreciente y se lavaron cuatro veces por centrifugación y resuspensión (4 °C, 1.500g x 5 min) en 20 ml de medio. El agregado de células de la última centrifugación se resuspendió en un volumen pequeño de medio (2.5-5 ml) y el número total de células y su viabilidad (rutinariamente superior al 95%) se determinó por el método del azul de tripán. El número de células totales y el número de células viables (que excluyen el colorante), se determinó usando una cámara de conteo de Neubauer oscilando el número de



células viables obtenidas por cada ovario entre  $10^6$ - $2 \times 10^6$ , según el experimento.

Las CGO se inocularon (en 1 ml de medio McCoy's 5a suplementado con HEPES, L-glutamina y antibióticos) para dar una densidad celular constante ( $\sim 1 \times 10^6$  células viables/cm<sup>2</sup>) en placas estériles individuales Falcon primaria (35x10 mm) o de 24/48 pocillos y los cultivos se mantuvieron bajo atmósfera húmeda en un incubador Heraeus a 37 °C y una pCO<sub>2</sub> del 5% tal y como se ha descrito con anterioridad (Fanjul *et al.*, 1983 y 1993; Santana *et al.*, 1995 y 1996). Al final de cada experimento, los medios de cultivo de los distintos grupos experimentales se colectaron y guardaron (-20°C) para las correspondientes determinaciones bioquímicas tal y como se detalla mas adelante.

**2.2.2. Cultivo de células tumorales murinas de Leydig (clon MA-10).** Las células tumorales de Leydig MA-10 fueron donadas a uno de los directores del trabajo (JQA) por el Dr. Ascoli (Department of Pharmacology, Iowa University, School of Medicine). Estas células que producen progesterona en respuesta a hCG/LH, EGF y otros ligandos pero no secretan testosterona por no expresar la P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa (Ascoli, 1981a y 1981b), se utilizaron como otro modelo esteroideogénico y sirvieron de control negativo en algunos experimentos.

Las células se cultivaron en placas estériles de 24 ó 48 pocillos (Costar; Cambridge, MA) en medio de cultivo Waymouth MB752/1 suplementado con 20 mM de HEPES, 2 mM L-glutamina, 1,12 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 15% suero de caballo y 50  $\mu$ g/ml gentamicina, hasta alcanzar el 65-75 % de confluencia. Los cultivos se mantuvieron bajo atmósfera húmeda en un incubador Heraeus a 37 °C y una pCO<sub>2</sub> del 5%. Para la realización de los estudios de respuesta esteroideogénica las células se mantuvieron durante los tiempos indicados en cada experimento en el mismo medio libre de suero (Ascoli, 1981a y 1981b), y al final los medios de cada experimento se guardaron congelados (-20°C) para la determinación de progesterona por el RIA que se describirá mas adelante.

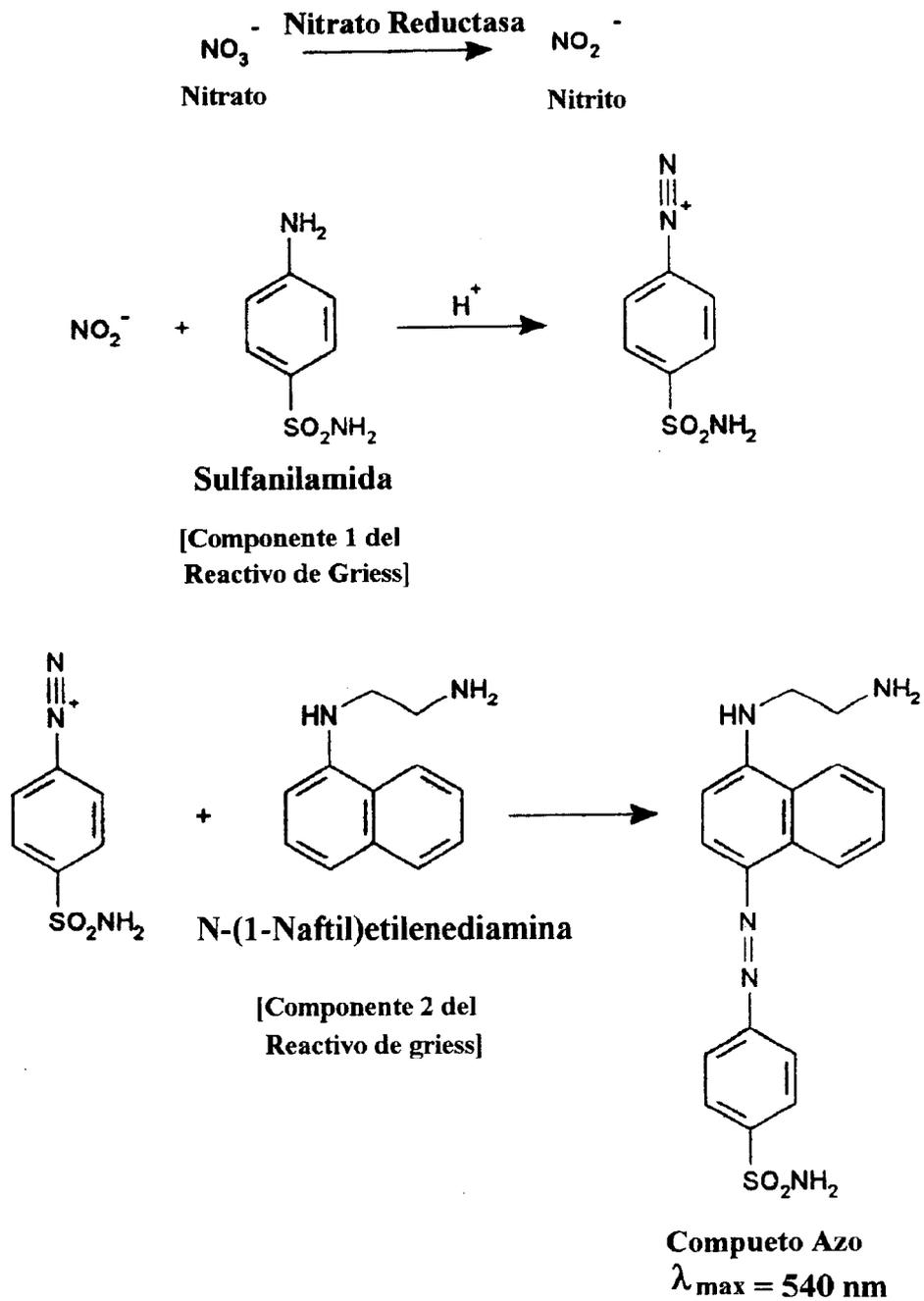
**2.2.3. Cultivo de macrófagos murinos J774.** La línea celular de macrófago murino J774

fue donada por el Dr. M. Fresno (CBM, Universidad Autónoma de Madrid), y se caracterizan por mantener la capacidad de generar NO en respuesta a lipopolisacárido bacteriano (LPS) y a distintas combinaciones de citoquinas, (Sthuer & Marletta, 1985 y 1989). Las células se cultivaron en 1 ml de medio DMEM suplementado con 20 mM HEPES, 1,12 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 10 % FCS y antibióticos (penicilina/estreptomicina) usando placas Corning estériles de 24 ó 48 pocillos. Para la puesta a punto de los métodos experimentales que se describen en el siguiente epígrafe, al alcanzar los cultivos un 65-75 % de confluencia, se cambió al mismo medio de cultivo con solo un 2 % de FCS, y como en los casos anteriores, los cultivos se mantuvieron bajo atmósfera húmeda en un incubador Heraeus a 37 °C y una pCO<sub>2</sub> del 5%.

### 2.3. Métodos analíticos utilizados para la determinación de la actividad de la vía del óxido nítrico:

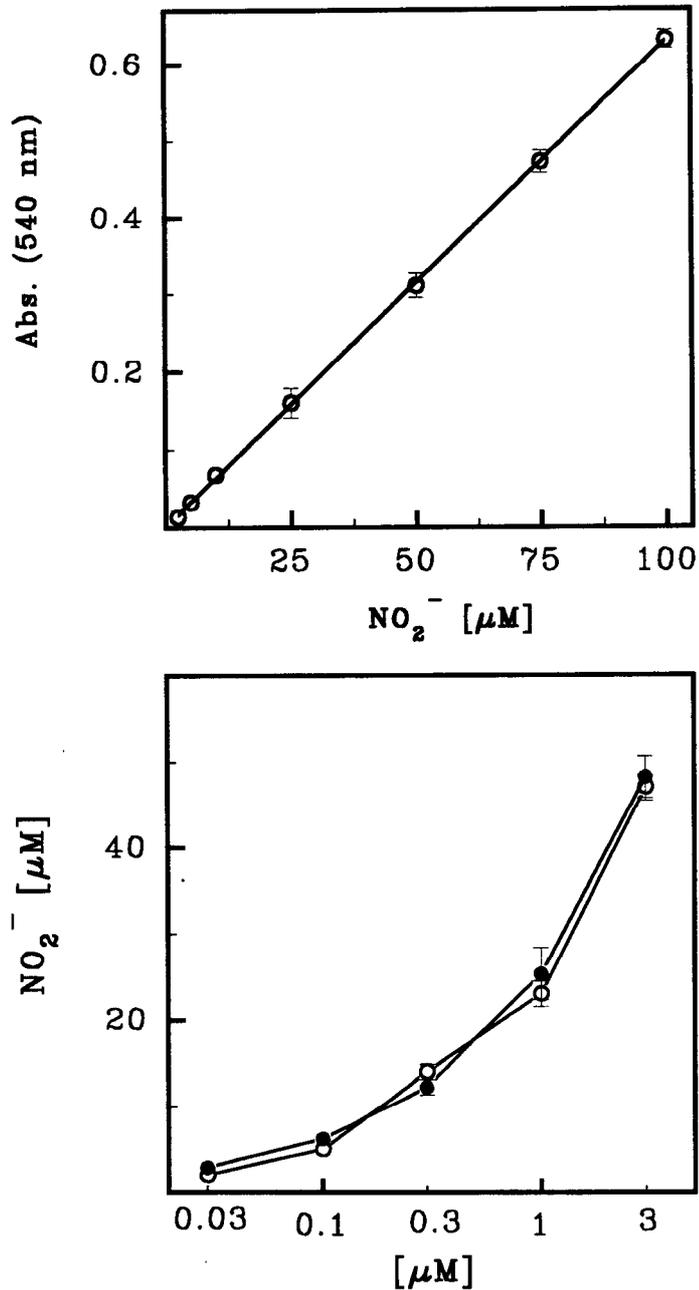
**2.3.1. Determinación de nitritos.** Los nitritos acumulados en el medio de cultivo, que reflejan la producción celular de NO (Sherman, 1993), se determinaron espectrofotométricamente por un método basado en la reacción de Griess (**Figura 2.4**) y que tal y como se describió en la introducción de esta memoria se basa en la oxidación del NO, en medio acuoso, a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en presencia de Fe<sup>2+</sup>. Los nitritos producidos reaccionan con sulfanilamida (**Figura 2.4**) en solución ácida de naftil-etilendiamina para formar un derivado azo que puede ser monitorizado a 540 nm (Green *et al.*, 1982). Como puede observarse en la **Figura 2.5** (panel superior) una curva de calibrado típica muestra linealidad respecto a la concentración de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en un amplio rango de concentraciones (1-50 μM). Puesto que el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> puede ser oxidado a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en presencia de Fe<sup>2+</sup>, y aunque los cultivos de CGO se realizaron en medio libre de suero que hace previsible que la acumulación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sea mínima en estas condiciones experimentales, se evaluó en una serie de experimentos iniciales la producción total de NO como la suma de especies oxidadas (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) usando reactivos preparados (Cayman's Nitrate/Nitrite Assay Kit; Alexis Co. Läufelfingen, Suiza). El método se basa en la reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en presencia de nitrato reductasa (E.C. 1.6.6.2) y usando como coenzimas FAD y NADPH (Klatt *et al.*, 1993), seguido de la determinación de nitritos por

Figura 2.4. Esquema general de la reacción espectrofotométrica para la determinación de nitritos.



Fundamento del método espectrofotométrico mostrando la reacción de nitritos con sulfanilamida en solución ácida de naftil-etilendiamina.

Figura 2.5. Esquema de la linealidad de la reacción de Griess y correlación entre la determinación de  $\text{NO}_2^-$  y especies oxidadas totales del NO.



**Panel superior:** Linealidad del método en un rango típico de nitritos (1-100  $\mu\text{M}$ ) realizada en medio McCoy's 5a sin suero y usando los reactivos descritos. **Panel inferior:** Correlación entre la determinación de  $\text{NO}_2^-$  (círculos abiertos) o especies oxidadas totales del NO expresados como la suma de  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  usando el método de la nitrato reductasa (círculos negros) usando NPS (0,03-1  $\mu\text{M}$ ) como generador de NO durante 24 h en medio de McCoy's 5a sin suero.

el método espectrofotométrico descrito (Muhl & Pfeilschifter, 1994). Tal y como puede observarse en experimentos control (**Figura 2.5**, panel inferior) al incubar durante 24 horas cantidades crecientes de NPS (0,03 -1  $\mu\text{M}$ ) como donante de NO en medio McCoy's 5a libre de suero, se obtienen resultados para las concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  esencialmente idénticos independientemente de la previa incubación con nitrato reductasa, razón por la que en los experimentos siguientes se optó simplemente por incubar en paralelo y durante todo el periodo experimental las curvas de calibrado estériles de nitrito disueltas en medio de cultivo.

**2.3.2. Determinación directa de la actividad enzimática de iNOS en células intactas.** El método radioenzimático está basado en los publicados para la determinación de actividad NOS en homogeneizados celulares (Bredt & Snyder, 1990) pero aplicandolo a la capacidad de las células intactas de convertir el grupo aninoguanidino terminal de la [ $^3\text{H}$ ]arginina en [ $^3\text{H}$ ]citrulina (Durante *et al.*, 1995). Con este método se consigue la ventaja adicional de poderse evaluar simultaneamente la acumulación de nitritos en el medio de cultivo y la actividad del enzima inducido en las mismas células.

Una vez aspirados los medios de los distintos tiempos y tratamientos (realizados por triplicado o cuadruplicado en todos los casos) se reservan para la determinación de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  y las células se lavan tres veces con 1 ml de buffer fosfato salino (PBS). La medida de la actividad NOS, se inicia añadiendo a cada grupo de células 0.2 ml de PBS conteniendo 0.1 % de BSA y 1.6  $\mu\text{M}$  de arginina y [ $^3\text{H}$ ]arginina ( $\sim 2 \times 10^6$  dpm/nmol) tal y como se indica en la **Figura 2.6**. Después de incubar con agitación durante tiempos variables, se añade a cada pocillo [ $^{14}\text{C}$ ]citrulina (10.000 dpm) para calcular la recuperación y se tomaron alícuotas del medio de incubación (50  $\mu\text{l}$ ) que se pasaron por columnas de intercambio iónico Dowex  $\text{H}^+$ -AG 50W-X8 equilibrada con HEPES 20 mM (pH 5.5) para separar el producto formado [ $^3\text{H}$ ]citrulina del sustrato [ $^3\text{H}$ ]arginina de la reacción (Bredt & Snyder 1990). Después de incubar las columnas durante 5 minutos se forzaba el paso de la fase móvil con aire a presión y en una alícuota del eluato (200  $\mu\text{l}$ ) conteniendo la fracción [ $^3\text{H}$ ]/[ $^{14}\text{C}$ ]citrulina no retenida se determinaba la radioactividad asociada a cada muestra, diluida en 15 ml de líquido de centelleo Optiscint Hisafe 3 (Pharmacia, Uppsala, Suecia.) usando un contador LKB Wallac.

Tal y como puede observarse en la **Figura 2.6** (panel superior) utilizando macrófagos J774 estimulados durante 24 h con LPS o IFN $\gamma$ , la actividad iNOS fue lineal respecto al tiempo de incubación (30-240 min) demostrándose así que las cinéticas se obtuvieron bajo condiciones de linealidad frente al tiempo (Leatherbarrow, 1990), y la densidad de células por pocillo (no se muestran los resultados). Además para asegurar que se trabajaba con concentraciones saturantes de sustrato se estudió la cinética del enzima (panel inferior), para incubando las células durante 1 hora en presencia de distintas concentraciones de arginina fría (0,25-400  $\mu$ M).

La actividad (A) del enzima se expresó como:

$$A = \text{pmoles producto} / \text{hora} \times 10^6 \text{ células}$$

donde:

$$A = (n_s \times f_T) / t / \text{mg proteínas totales.}$$

siendo:

$$n_s = \text{nmoles de sustrato total.}$$

$$f_T = [(^{14}\text{C}_A / ^{14}\text{C}_R) \times (^3\text{H}_R / ^3\text{H}_A)] , \text{ tal que } 0 \leq f_T \leq 1$$

El valor 0 corresponde a nula transformación de sustrato.

El valor 1 corresponde a la transformación total de sustrato.

donde,

$$^{14}\text{C}_A / ^{14}\text{C}_R: \text{ es la recuperación de producto durante el proceso de extracción}$$

siendo,

$$^{14}\text{C}_A: \text{ dpm de } [^{14}\text{C}]\text{Citrulina añadidas a cada pocillo al finalizar la reacción.}$$

$$^{14}\text{C}_R: \text{ dpm de } [^{14}\text{C}]\text{Citrulina recuperadas.}$$

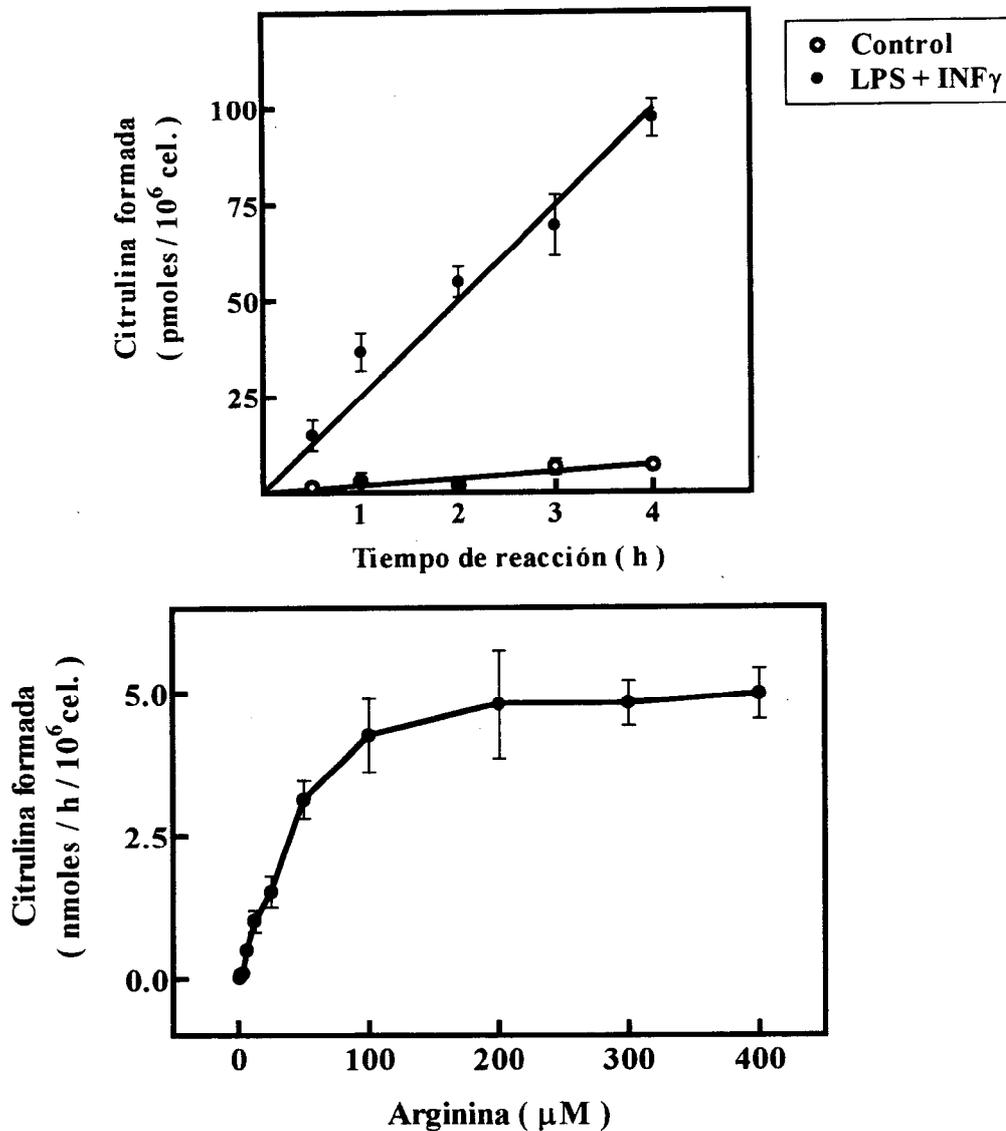
$$^3\text{H}_A: \text{ dpm de } [^3\text{H}]\text{Arginina añadidas a cada pocillo.}$$

$$^3\text{H}_R: \text{ dpm de } [^3\text{H}]\text{Arginina obtenidas.}$$

$$t, \text{ el tiempo de reacción en minutos, ajustado de modo que } (f_T \leq 0.15).$$

En todos los casos, las incubaciones se ajustaron siempre a condiciones de tiempo que asegurasen un porcentaje de transformación del sustrato inferior al 15%.

Figura 2.6. Esquema del método de determinación simultánea de nitritos y actividad NOS como conversión de [ $^3\text{H}$ ]arginina en [ $^3\text{H}$ ]citrulina en macrófagos J774.



Los macrófagos se cultivaron y estimularon con IFN $\gamma$  (100 U/ml) o LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) como se detalla en el apartado correspondiente de esta memoria. Al final de 24 h en cultivo, los medios se aspiraron y reservaron para la determinación de nitritos y las células se lavaron tres veces (3x1 ml) con PBS e incubaron en presencia de 0.2 ml de buffer conteniendo 1.6  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]arginina. A los tiempos que se detallan (**panel superior**), se tomaban alicuotas (50  $\mu\text{l}$ ) del medio de cultivo y el producto de la reacción [ $^3\text{H}$ ]citrulina se separaba del sustrato por intercambio iónico en columnas Dowex H<sup>+</sup>-AG 50W-X8 suplementadas con [ $^{14}\text{C}$ ]citrulina (10,000 dpm) para calcular en cada caso la recuperación. La radioactividad asociada con el producto de la reacción se determinó por contaje de centelleo líquido usando la relación de canales [ $^3\text{H}$ ]/[ $^{14}\text{C}$ ] asociada a la fracción de citrulina como se detalla oportunamente en esta memoria. Para estudiar la saturabilidad del enzima, se realizaron experimentos incubando las células con concentraciones variables de arginina no radiactiva, y determinándose la conversión de [ $^3\text{H}$ ]arginina durante 1 hora (**panel inferior**).

Con esta aproximación experimental es posible medir en las mismas células la acumulación de especies oxidadas de NO, prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) y actividad celular de iNOS, y se ha utilizado en esta memoria usando de forma rutinaria un tiempo de 240 min de incubación, para los experimentos en los que se investigó la actividad NOS en CGO.

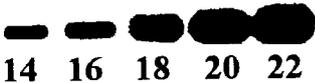
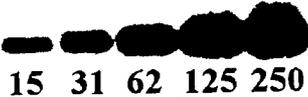
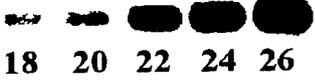
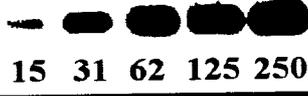
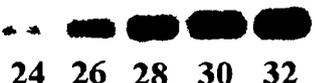
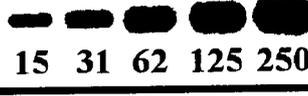
Este método tiene la ventaja añadida de poder determinarse la actividad iNOS, al mismo tiempo que especies oxidadas de NO, prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) y progesterona, en pocas células ( $0.5 \times 10^6$ - $1 \times 10^6$ ) frente a los métodos tradicionales que usan hasta diez veces mas cantidad, y que por el escaso número de células obtenidas por ovario ( $2-3 \times 10^6$ ) no permitiría la realización de la misma cantidad de experimentos simultaneos debido al elevado número de animales a emplear.

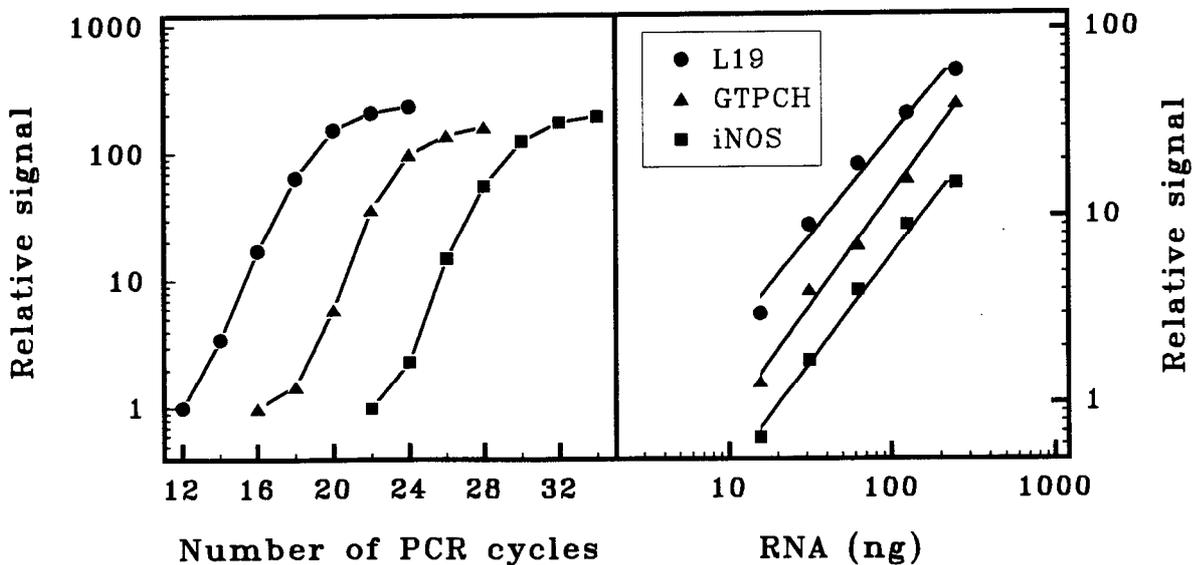
**2.3.3. Estudio de la expresión de iNOS y GTP-ciclohidrolasa.** Debido a la poca cantidad de células obtenibles por ovario (Orly *et al.*, 1995; Santana *et al.*, 1996), el estudio de la inducción de los diferentes mRNA en CGO se realizó por la técnica de la transcriptasa inversa-reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR), que se describe en detalle más adelante.

En la fase de amplificación, se usaron cebadores específicos basados en las secuencias conocidas de los genes correspondientes a la forma inducible de la GTPCH (tipo-I) de hígado (Hatakeyama *et al.*, 1991; Hattori & Gross, 1993) e iNOS de macrófago (Lui *et al.*, 1993) resumidos en la **Tabla II**, donde también se dan las secuencias del resto de los cebadores utilizados en esta memoria.

En la **Figura 2.7** se muestra densitometrada la linealidad de la señal de amplificación de iNOS, GTPCH y L19 respecto al número de ciclos (panel izquierdo) y la linealidad de la señal de amplificación respecto a la cantidad de RNA (panel derecho). Para esto se usaron células granulosa ovárica estimuladas con FSH en combinación con IL1 $\beta$  durante 48 horas, se extrajo el RNA total y se retrotranscribió a cDNA (como se indica en el apartado correspondiente 2.6) para ser sometido a diferentes ciclos de amplificación (**Tabla III**) en

Figura 2.7 Linealidad de la señal de amplificación de iNOS, GTPCH y L19 respecto al número de ciclos y cantidad de RNA.

	Number of PCR cycles	RNA (ng)
L19	 14 16 18 20 22	 15 31 62 125 250
GTPCH	 18 20 22 24 26	 15 31 62 125 250
iNOS	 24 26 28 30 32	 15 31 62 125 250



En estos experimentos se usaron los cebadores específicos citados en la Tabla II. El RNA se extrajo de células coestimuladas con FSH (200 ng/ml) e IL18 (10 ng/ml) y una cantidad fija (125 ng) se amplificó con diferentes ciclos (panel izquierdo) y cantidades crecientes (15.6-250 ng) se sometieron a amplificación durante 16 ciclos para la L19, 27 ciclos para iNOS o 22 ciclos para la GTPCH (panel derecho).

presencia de Dig-UTP. Los productos de amplificación se revelaron como se describe en la **Tabla IV**.

**2.3.4. Determinación de iNOS por western-blott.** Las CGO ( $\sim 10^7$  células por tratamiento) se lavaron dos veces con PBS pH 7.4 y se lisaron durante 30 min, con agitación rotacional a 4°C, con buffer PBS/TDS (10 mM fosfato sódico, 5mM EDTA, 0.9% NaCl, 1% TX-100, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 0,2%  $\text{NaN}_3$ , 1mM PMSF, 15mM iodoacetamida, 10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina, 5 $\mu\text{g/ml}$  aprotinina, pH 7.4) y se centrifugaron (14.000 rpm, 20 min., a 4°C) para limpiar la fracción celular soluble de restos de membrana y DNA.

Se usaron alícuotas de este sobrenadante para medir proteínas totales por el método del azul de comassie (Bradford, 1976) o del ácido bicinconínico (BCA) para posteriormente igualar las concentraciones de proteínas de los distintos tratamientos con tampón de electroforesis (6.2 mM Tris, 2% SDS, 20% glicerol, 5mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 1% de azul de bromofenol a pH 6.8). Después de calentar las muestras durante 5 minutos a 100°C se llevó a cabo la separación electroforética (Laemmli, 1970) a 4°C en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5% de reticulación. En todas las electroforesis se usaron patrones de pesos moleculares preteñidos.

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham, Little Chalfont, England) mediante un sistema de transferencia en semiseco (Trans Blot, BioRad, Madrid) en tampón de Bjerrum y Schafer-Nielsen (48mM Tris, 39mM glicerol, 20% metanol y 0.0375% de SDS a pH 9.4) a 4°C e incubadas con solución de bloqueo TBS-T (20mM Tris, 137mM NaCl, 0.1% Tween-20 y 5% de leche desnatada) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas eran entonces sometidas a incubación con una dilución 1:2,500 de un anticuerpo monoclonal específico para la forma inducible de NOS en macrófago (anti-iNOS, macNOS, Transduction Laboratories, KE, USA) seguida de incubación con una dilución 1:2,500 de un anticuerpo contra ratón conjugado a peroxidasa (Amersham). La proteína fue visualizada usando usando un kit comercial (ECL chemiluminiscent detection Kit, Amersham) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

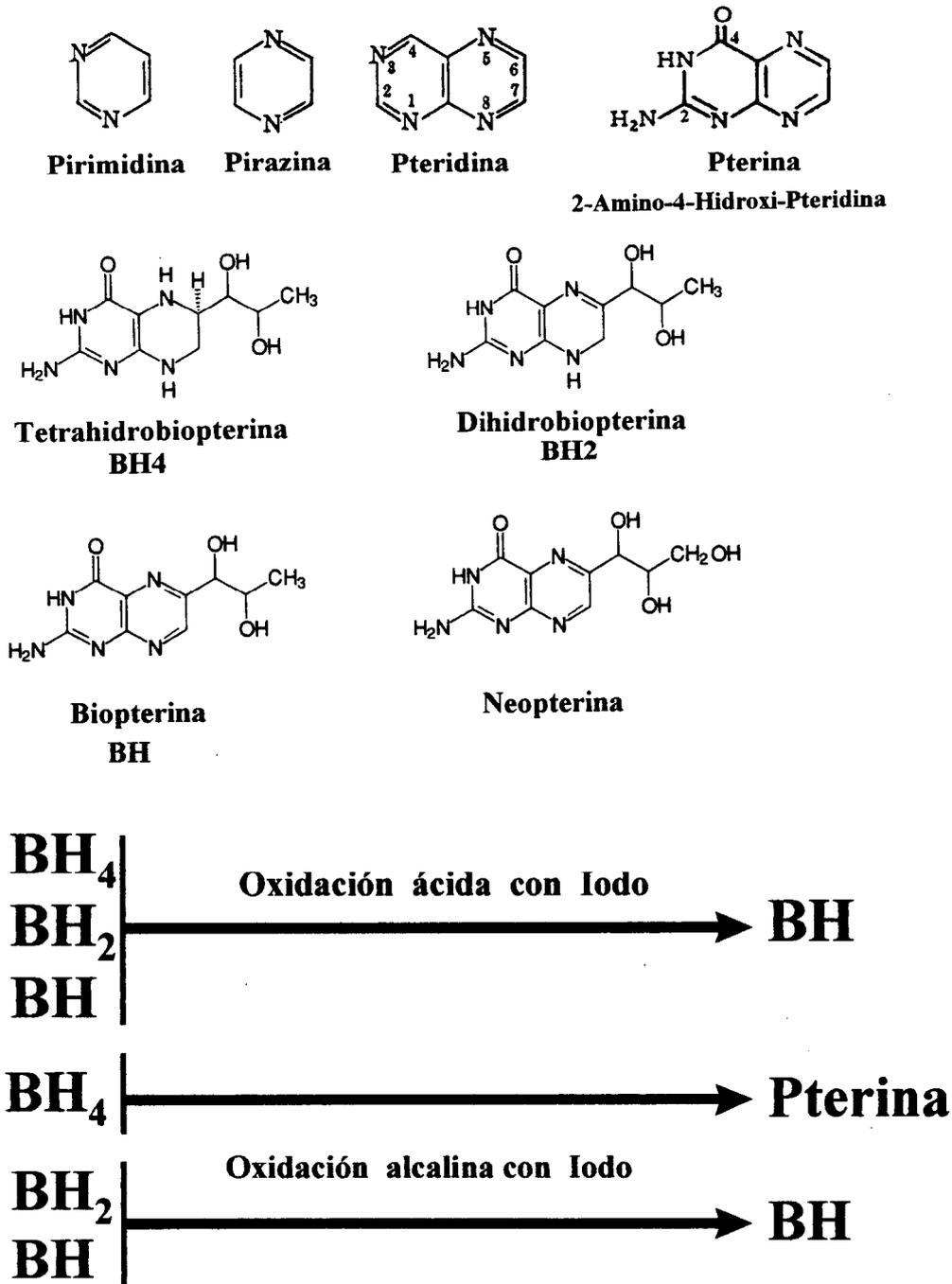
**2.3.5. Determinación de tetrahidrobiopterina (BH4).** El BH4 y los intermediarios de su biosíntesis se caracterizan por ser derivados de la pteridina, compuesto cuya estructura está formada por la fusión de dos anillos de diazinas (heterociclos hexagonales de dos átomos de nitrógeno): la pirazina y la pirimidina. Todos estos compuestos tienen en común el núcleo 2-amino-4-hidroxipteridina (pterina) y pueden aparecer como formas tetrahidro, dihidro o como formas totalmente oxidadas de esta estructura, y que pueden además diferenciarse por contener una cadena hidroxilada en C6, específica de cada pterina (**Figura 2.8**).

Esta diferencia estructural le confiere a cada pterina una movilidad cromatográfica específica que, unida a la capacidad de todos estos compuestos para emitir fluorescencia, conforman la base del método de separación por cromatografía de alta eficacia (HPLC) utilizado en este estudio, y que describimos a continuación.

\* **Oxidación de biopterina y de sus formas reducidas** . La biopterina y sus formas reducidas, BH2 y BH4 pueden ser cuantificados mediante oxidación ácida y/o alcalina con iodo (Fukushima & Nixon, 1980). Las pteridinas reducidas BH4 y BH2 al ser tratadas con una solución de I<sub>2</sub>/KI potásico en medio ácido son totalmente oxidadas a biopterina, mientras que la misma reacción en condiciones alcalinas sólo oxida al BH2, ya que el BH4 por su alta inestabilidad en condiciones alcalinas, pierde la cadena hidroxilada en C6 y se convierte en una pterina (**Figura 2.8**). De esta forma, la diferencia entre la cantidad de biopterina formada en condiciones ácidas (biopterina + BH2 + BH4) y la biopterina formada a pH básico (biopterina + BH2 - BH4) corresponde a la cantidad de tetrahidrobiopterina en la muestra.

\* **Preparación de muestras para la determinación de BH4 intracelular.** Las células con los distintos tratamientos se cultivaron en botellas de 25 cm<sup>2</sup> y para terminar los experimentos se aspiraron los medios y las células se lavaron rápidamente dos veces con tampon PBS 10 mM (sin Ca<sup>2+</sup> y sin Mg<sup>2+</sup>) y colectaron con un rascador de teflón (Costar, Cambridge M.A.). Las células se recuperaron por centrifugación (1.500 rpm, 4°C, 10 min.) y se lisaron en agua bidestilada y dos pulsos de ultrasonidos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (14.000 rpm, 4°C, 15 min.) y los correspondientes

Figura 2.8 Estructura química de las pteridinas y oxidación de sus formas reducidas.



Panel superior: Origen estructural de las pteridinas.

Panel inferior: Esquema de cuantificación del BH<sub>4</sub>, mediante oxidación ácida y alcalina con iodo.

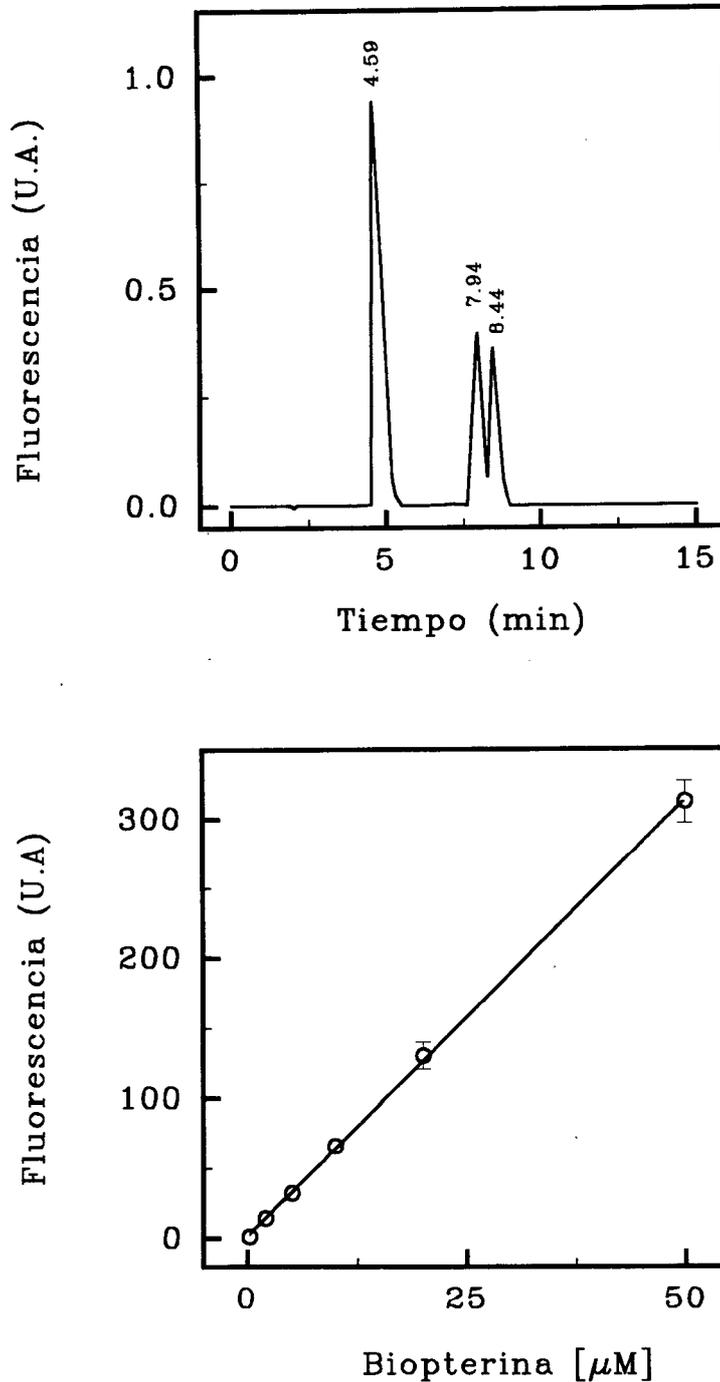
sobrenadantes se sometieron a tratamiento (1 hora a temperatura ambiente, en la oscuridad) con solución oxidante  $I_2(0.1M)/KI(0.5M)$  en HCl 1N (oxidación ácida) o NaOH 1N (oxidación alcalina). Finalizado el tiempo de reacción, las muestras se trataron con ascorbato sódico (0.1M) para reducir el iodo libre residual y se neutralizaron en su caso con NaOH 1N o HCl 1N, ajustando luego con tampón Tris 3M, el pH hasta 6,8.

\* **Preparación de muestras para la determinación de pteridinas en los medios extracelulares.** Puesto que el BH<sub>4</sub>, en medio acuoso, es un compuesto inestable y susceptible de oxidación espontánea a BH<sub>2</sub> y biopterina, y dado que estos dos últimos compuestos son permeables a la membrana celular (Gross & Levi, 1992), los medios extracelulares se sometieron a idénticos procesos de sonicación, centrifugación y oxidación ácida que las muestras celulares.

\* **Cuantificación de pteridinas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).** Las muestras oxidadas como se ha descrito, se inyectan en una precolumna Ultrasphere C<sub>18</sub> (5μm, 45x4.6mm), unida a una columna analítica Ultrasphere C<sub>18</sub> (5μm, 250x4.6mm) de fase reversa (Beckman, CA, USA) y la cuantificación de pteridinas se realiza por HPLC con un aparato Beckman (System Gold 126) provisto de un detector de fluorescencia (Spectra System FL-3000, Thermo SP., FL, USA). Las pteridinas se eluyeron isocráticamente usando como fase móvil tampón fosfato 50mM, EDTA 1mM, 5% (v/v) metanol a pH 3, a un flujo constante de 1 ml/min y se detectaron por fluorescencia a longitudes de onda de excitación y de emisión de 350 y 440 nM, respectivamente. Los tiempos de recorrido por cromatograma fueron rutinariamente de 15 min. sin ninguna previa regeneración de la columna durante al menos 50 muestras, y los tiempos de retención de las distintas pteridinas se indican en la misma **Figura 2.9** (panel superior).

El método de calibrado fue el de oxidación de muestras conocidas de BH<sub>4</sub> a biopterina bajo condiciones experimentales estrictamente idénticas a las muestras. Las curvas de calibración (**Figura 2.9**, panel inferior) preparadas a partir de auténtica biopterina, son lineales en el rango de 0.2-50 pmoles por 100μl de inyección.

Figura 2.9. Separación de las distintas pteridinas mediante HPLC y curva de calibración típica de biopterina.



**Panel Superior:** cromatograma donde se representa la separación de distintas pteridinas por HPLC. De izquierda a derecha: neopterina (TR=4.59), biopterina (TR=7.94), Pterina (TR=8.44). **Panel inferior:** rango de linealidad de una curva de calibrado típica de biopterina preparada a partir de biopterina auténtica.

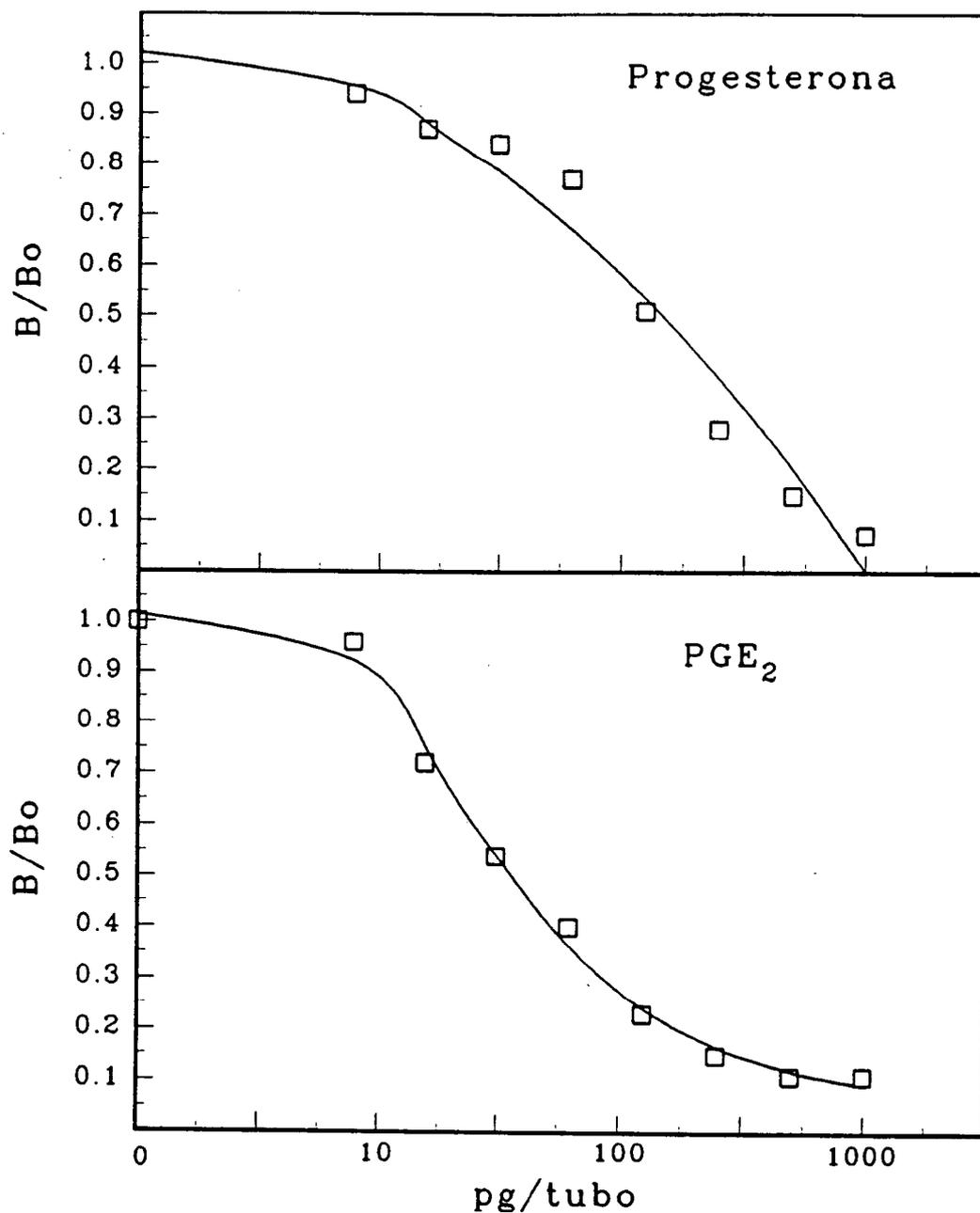
**2.4. Evaluación de la actividad esteroidogénica de la célula granulosa ovárica.**

**2.4.1. Radioinmunoensayo de progesterona.** La determinación de progesterona se realizó en alícuotas de los medios individuales de cada placa o pocillo (Fanjul *et al.*, 1983 y 1995), a dos diluciones distintas usando un anticuerpo monoclonal anti-progesterona a la dilución final (1:20.000) recomendada por el fabricante (Sigma chemical Co., St Louis, MO, USA). La unión específica al anticuerpo fue del 36% y tiene una reacción cruzada con andrógenos (15%) y menos del 0.01% con otros esteroides. Para separar la hormona libre de la ligada se usó una suspensión fría (4°C) de carbón activo/dextrano (0.5%:0.05%) en tampón TBS 50 mM suplementado con azida sódica 0.1% a pH 7.4 (England *et al.* 1974). Las concentraciones se calcularon por métodos estadísticos establecidos y se ajustaron a una curva mediante una ecuación de cuatro parámetros (Rodbard & Tacey, 1978; Jaffe *et al.*, 1979), y en la **Figura 2.10**, se muestra una curva de calibrado típica de este ensayo.

**2.4.2. Ensayo de la actividad del enzima P450AROM.** La actividad de la P450AROM, que convierte a todos los precursores C19 androgénicos en sus correspondientes estrógenos (Miller, 1988), se determinó en células intactas por un método radioenzimático basado en la conversión estereoespecífica de [1 $\beta$ 2 $\beta$ <sup>3</sup>H]androstendiona en <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O (Emoto & Baird, 1988) tal y como se ha descrito recientemente por este laboratorio (Santana *et al.*, 1995).

Después de los tratamientos y tiempos detallados en cada experimento, las células se lavaron tres veces con 1 ml de buffer fosfato salino (PBS) y la medida de la actividad P450AROM se inició incubando, a 37°C y durante 4 horas, grupos de células (triplicados o cuadruplicados en todos los casos) en medio de cultivo con el sustrato radiactivo, [1 $\beta$ 2 $\beta$ <sup>3</sup>H]androstendiona, a la dilución adecuada para conseguir una concentración de 10 $\mu$ M (5x10<sup>4</sup> dpm/nmol). Posteriormente para la separación del sustrato radioactivo libre del <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O formada durante la reacción de aromatización, se tomaban alícuotas del medio de incubación (2x400 $\mu$ l) a las que se añaden 200 $\mu$ l de una suspensión fría (4°C) de activo/dextrano (5%:0.5%) en TBS 50mM suplementado con azida sódica 0.1% a pH 7.4 (England *et al.* 1974; Emoto & Baird, 1988; Santana *et al.*, 1996).

Figura 2.10. Curvas típicas de los radioinmunoensayos de progesterona y prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>).



Después de incubar (15 min., 4°C) se centrifugaron los medios (15 min., 4°C, 3000xg) y alícuotas de 400 µl fueron recogidas del sobrenadante para determinar la radioactividad en cada caso por centelleo líquido. En las condiciones descritas, la aromatización del anillo de [<sup>3</sup>H]androstendiona para formar estrona, fue lineal hasta las 8 horas, y la radiactividad de los blancos no específicos, obtenidos de medio en ausencia de células fue menor de 400 dpm/pocillo.

**2.4.3. Estudio por RT-PCR de la expresión de los enzimas esteroideogénicos P450<sub>SCC</sub>, 3βHSD y P450<sub>AROM</sub> en célula granulosa ovárica.** Para el estudio de la inducción de la expresión de los enzimas esteroideogénicos de la biosíntesis de progesterona (P450<sub>SCC</sub> y 3βHSD) y estrógenos (P450<sub>AROM</sub>) se utilizaron cebadores específicos previamente publicados (Orly *et al.*, 1994) y de uso rutinario en este laboratorio (Santana *et al.*, 1996), y usando en todos los casos la proteína mitocondrial L19 como estándar interno de amplificación (Orly *et al.*, 1994).

### **2.5. Estudio de la biosíntesis de prostaglandinas en célula granulosa ovárica.**

**2.5.1. Radioinmunoensayo de prostaglandina E<sub>2</sub>.** La acumulación de PGE<sub>2</sub> en el medio de cultivo se realizó por un método de RIA específico usando un anticuerpo monoclonal anti-PGE<sub>2</sub> comercial, a la dilución final (1:1000) recomendada por el fabricante (Sigma Chemical Co. St. Louis MO).

Las fases libre y unida de la hormona se separaron con una suspensión fría (4°C) de carbón activo/dextrano (1%:0.1%) en tampón fosfato 10 mM suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) al 0.1% y azida sódica 0.1% a pH 7.4 tal y como hemos descrito recientemente (Santana *et al.*, 1996). En la **Figura 2.10** se muestra una curva estándar del RIA ajustado por los métodos estadísticos descrito en apartados (3.4.1) anteriores.

**2.5.2. Determinación de COX-2 por western-blott.** Se siguió exactamente el mismo protocolo que en la determinación de iNOS por western-blott (apartado 2.3.4.), excepto el

anticuerpo monoclonal específico para COX-2 (anti-COX2, Transduction Laboratories, KE, USA) que se usó a una dilución 1:1000.

**2.5.3. Estudio por RT-PCR de la expresión del mRNA de la prostaglandina endoperoxido sintasa/ciclooxigenasa tipo-2 (COX-2) en célula granulosa ovárica.** Para el estudio de la inducción de la expresión de la COX-2, que representa la isoforma inducible del enzima (DeWitt, 1991) se utilizaron cebadores específicos previamente publicados y basados en la secuencia conocida del gen correspondiente en macrófagos (Lee *et al.*, 1992) y siguiendo el método decrito por este laboratorio (Santana *et al.*, 1996).

Los detalles del método se describen a continuación, dandose los perfiles de amplificación se detallan en la **Tabla III** de esta memoria.

## **2.6. Metodos de amplificación de mRNA usando técnicas de transcriptasa inversa-reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR).**

**2.6.1. Aislamiento de RNA total.** El RNA total se obtuvo a partir de triplicados ( $10^6$  células/pocillo) utilizando los reactivos preparados que se detallaron en el apartado correspondiente (Chomczynski & Sacchi, 1987), y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lisaron con 0.4ml del reactivo/pocillo, los triplicados se combinaron en un tubo eppendorf y se suplementaron con 0.2 ml de cloroformo. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 s. y la suspensión se centrifugó ( $12,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 20 min) añadiendose a la fase acuosa superior (0.5 ml) un volumen igual de isopropanol.

Los tubos se dejaron en reposo durante 24 horas ( $-20^\circ\text{C}$ ) para precipitar el RNA que se colectó por centrifugación ( $12,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 20 min) y se resuspendió en  $30\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}/\text{DEPC}$ . Una alícuota ( $7 \mu\text{l}$ ) se destinó para determinar la absorbancia a 260 nm y la relación  $A_{260}/A_{280}$  fue siempre igual o superior a 1.6. En todos los experimentos el rendimiento fue de 2-6  $\mu\text{g}$  RNA total/ $10^6$  células, y las muestras se almacenaron ( $-70^\circ\text{C}$ ) hasta su utilización.

**2.6.2. Síntesis de cDNA.** Se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de RNA total que se incubó con 0.5  $\mu\text{g}$  de pd[T]<sub>12-18</sub> y 4 U de AMV-transcriptasa inversa en 20  $\mu\text{l}$  de tampón 1xPCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH9, 0.1% Tritón X-100), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTPs y 20 U de RNasin durante 75 min/42°C. Finalizada la reacción, las muestras se calentaron (95°C) durante 5-10 min y se enfriaron en hielo y guardaron (-20°C) hasta su utilización posterior. El cDNA se diluyó con 60  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O/DEPC.

**2.6.3. Amplificación por Reacción de la Polimerasa en cadena (PCR).** Para la amplificación, se incubaron 10  $\mu\text{l}$  de cDNA (~15ng RNA) con tampón 1xPCR en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ , que contenía los siguientes componentes adicionales: 15 pmol (~125 ng) de la pareja de cebadores apropiada (**Tabla II**), 2.5  $\mu\text{M}$  Dig-11-dUTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.625 U. Taq DNA polimerasa. A las muestras, se les añadió además 50  $\mu\text{l}$  de aceite mineral y cada cDNA se amplificó con los perfiles térmicos (Santana *et al.*, 1996) que se da a continuación y se detallan en la **Tabla III**.

El termociclador se programó para un conjunto de cuatro programas conectados entre sí. Después de una desnaturalización inicial (3 min/94°C) se procedió a la amplificación de cada cDNA con los perfiles térmicos que se detallan en la **Tabla III**. En todos los casos se completaba la amplificación añadiéndoles un ciclo de polimerización (7min./72°C) para finalmente incubar las muestras a 4°C. Para terminar los experimentos, a cada muestra se le añadió 5  $\mu\text{l}$  de tampón de electroforesis (50% glicerol, 0.1% azul de bromofenol), procediéndose luego a su extracción con cloroformo y almacenamiento en frío (-20°C) hasta su análisis.

**2.6.4. Separación y detección de los productos amplificados.** Alícuotas (5-10 $\mu\text{l}$ ) de las muestras amplificadas se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (1.8%) en tampón TAE (40 mM Tris.acético, 1 mM EDTA, pH8). El gel se incubó en tampón de transferencia (0.4 M NaOH, 1.5 M NaCl) con agitación suave durante 15 min, y el cDNA se transfirió (30min) a una membrana de nylon cargada positivamente con un Posiblot (Stratagene, WI), la membrana se humedeció luego en tampón de transferencia y se sometió a cross-linking

**TABLA II.**

*Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los distintos enzimas estudiados en esta memoria.*

* Cebador	Secuencia de bases de la pareja de cebadores (5' → 3')	Longitud fragmento amplificado (pb)
<b>GTPCH-A</b> <b>GTPCH-B</b>	GGA TAC CAG GAG ACC ATC TCA TAG CAT GGT GCT AGT GAC AGT	372
<b>iNOS-A</b> <b>iNOS-B</b>	CTG CAG GTC TTT GAC GCT CGG GTG GAA CAC AGG GGT GAT GCT	807
<b>COX-A</b> <b>COX-B</b>	ACT CAC TCA GTT TGT TGA GTC ATT TTT GAT TAG TAC TGT AGG GTT AAT	583
<b>P450scc-A</b> <b>P450scc-B</b>	AGA AGC TGG GCA ACA TGG AGT CAG TCA CAT CCC AGG CAG CTG CAT GGT	536
<b>3βHSD-A</b> <b>3βHSD-B</b>	ACT GGC AAA TTC TCC ATA GCC TTC CTC CCA GCT GAC AAG TGG	405
<b>P450arom-A</b> <b>P450arom-B</b>	TGC ACA GGC TCG AGT ATT TCC ATT TCC ACA ATG GGG CTG TCC	271
<b>L19-A</b> <b>L19-B</b>	CTG AAG GTC AAA GGG AAT GTG GGA CAG AGT CTT GAT GAT CTC	194
<b>G3PDH-A</b> <b>G3PDH-B</b>	TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC	983

\* A = Sentido (sense)

B = Antisentido (antisense)

*Tabla III.*

<b>Protocolos de Amplificación</b>				
	<b>Nº de Ciclos</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Polimerización</b>
<b>iNOS</b>	29	1min./94°C	1.5min./58°C	1.5min./72°C
<b>GTPCH</b>	22	1min./94°C	1.5min./58°C	1.5min./72°C
<b>P450SCC</b>	18	1min./94°C	1.5min./63°C	1.5min./72°C
<b>P450AROM</b>	22	1min./94°C	1.5min./63°C	1.5min./72°C
<b>3BHSD</b>	16	1min./94°C	1.5min./63°C	1.5min./72°C
<b>COX2</b>	22	1min./94°C	2min./58°C	2min./72°C
<b>L19</b>	16	1min./94°C	1.5min./63°C	1.5min./72°C
<b>G3PDH</b>	18	1min./94°C	1.5min./58°C	1.5min./72°C

**TABLA IV.**

**Esquema del método de revelado por quimioluminiscencia de los productos de amplificación de los distintos genes estudiados.**

Paso	Solución (vol./cm <sup>2</sup> )	Tiempo de incubación (min)	Composición de las soluciones
Lavado	A (1 ml)	5	0.1 M ácido maléico, 0.15 M NaCl, 0,3% w/v Tween-20 (pH 7,5)
Bloqueo	B (1 ml)	30	1% reactivo de bloqueo en solución A
Incubación con anticuerpo	C (0.2 ml)	30	Anticuerpo antidigoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (1:10,000) en solución B
Lavado	A (1 ml)	15	
Lavado	A (1 ml)	15	
Equilibrado	D (0.2 ml)	5	0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> (pH 9.5)
Reacción	E (0.1 ml)	5	CSPD (1:500) en solución D

en un Stratalinker UV 1800 (Stratagene, WI).

La detección de los fragmentos amplificados se realizó por quimioluminiscencia (Su *et al*, 1994) usando reactivos preparados (Dig luminiscence detection kit) y siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Barcelona) tal y como se esquematiza en la **Tabla IV**. Después de eliminar el exceso de tampón, la membrana se colocó en una bolsa de hibridación e incubó a 37 °C/15 min, y para el revelado y posterior cuantificación se expuso (2-10 min) a una película Polaroid 667.

### 2.7. Otros métodos

**2.7.1. Determinación de proteínas.** La concentración de proteínas se determinó a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu (UV-160) por el método del azul de comassie (Bradford, 1976), usando un kit comercial (Bio-Rad Laboratories SA, Madrid). La determinación de proteínas en muestras diluidas o que contenían productos que interferían con el método anterior, se realizó a 562 nm, usando el método del ácido bicinónico (Smith, Krohn *et al*, 1985) con reactivos preparados obtenidos de Pierce Chemical Co., (Rockford, IL) cuyo rango de trabajo óptimo es de 0.5-20  $\mu$ g. Para la construcción de la curva estándar, se utilizó BSA en ambos casos.

**2.7.2. Ensayo de viabilidad celular.** Se realizó por el método de reducción de la sal amarilla de MTT al producto azul resultante de la acción de enzimas mitocondriales de células viables (Mossmann *et al.*, 1983). Después de cada experimento, el medio de cultivo de cada pocillo se guardó para las determinaciones hormonales, y se añadió a cada uno de ellos 500  $\mu$ l de medio de cultivo suplementado con antibiótico y 0,5 mg/ml de MTT. Las células se incubaron (4 horas, 37°C) y las reacciones se pararon añadiendo 500  $\mu$ l de SDS 20% en HCl 0,02 N a cada pocillo. Las placas de cultivo volvieron a ser incubadas durante toda la noche (37°C), y se determinó la absorbancia en cada pocillo a 562 nm en un espectrofotómetro Shimadzu (UV-160).

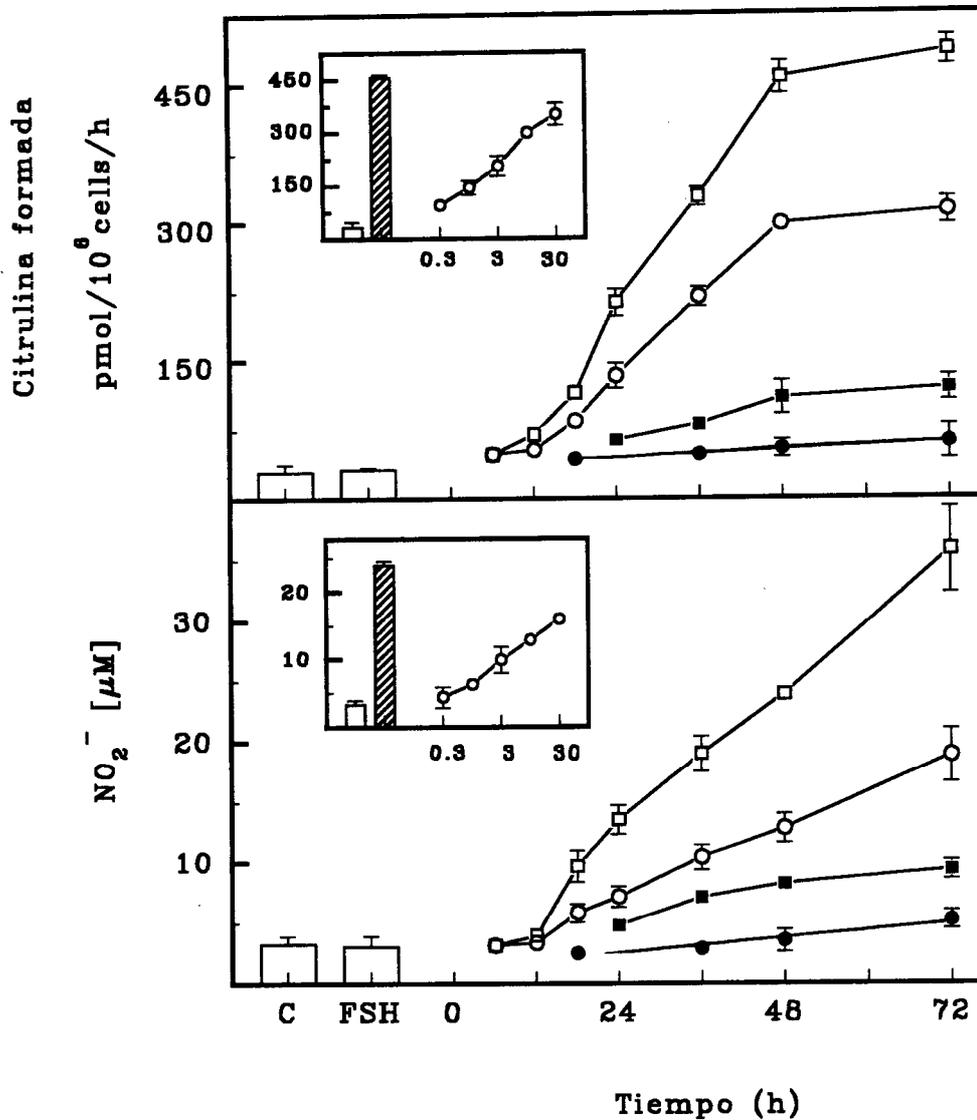
**2.7.3. Métodos estadísticos.** Las muestras fueron siempre triplicados o cuadruplicados, y los experimentos se repitieron al menos tres veces. La comparación entre los distintos tratamientos se realizó por el método de la T de Student o análisis de la varianza.

# RESULTADOS

**3.1. Estimulación de la actividad NOS en células granulosa tratadas con IL1 $\beta$ , FSH y análogos permeables del AMPc.** Los primeros experimentos de este trabajo se diseñaron para intentar identificar a la célula granulosa ovárica (CGO) como una posible fuente intraovárica de NO, cuya participación en la reacción inflamatoria asociada al proceso de ovulación (Espey, 1980) ha sido sugerida recientemente (Sukowski & Tsafiriri, 1994).

Las CGO indiferenciadas obtenidas, como se detalló en Materiales y Métodos, por punción en condiciones estériles de los ovarios de ratas inmaduras (21-22 días) tratadas con estrógenos (Santana *et al.*, 1995 y 1996), se cultivaron en medio McCoy's 5a (modificado y sin suero) y se trataron como se especificará oportunamente en cada experimento. Como se muestra en la **Figura 3.1**, que corresponde a los experimentos iniciales de esta memoria, las células se estimularon durante tiempos variables (6-72 h) con FSH, IL1 $\beta$  o la combinación de ambos agentes y al final de cada tiempo experimental se determinó la actividad NOS en términos de formación de [<sup>3</sup>H]citrulina (panel superior) y acumulación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en el medio de cultivo (panel inferior). La técnica para la determinación simultánea e independiente de la actividad enzimática de iNOS y acumulación de nitritos en el medio de cultivo, se puso inicialmente a punto usando la línea celular J774, y como se indicó en el apartado correspondiente de Material y Métodos (ver **Figura 2.6**) en las condiciones experimentales descritas la formación de [<sup>3</sup>H]citrulina a partir de sustrato radiactivo, es saturable respecto a la concentración de [<sup>3</sup>H]arginina y lineal respecto al tiempo de incubación. Usando este método, se puede evaluar de forma real la actividad del enzima en condiciones en que la acumulación de nitritos en el medio sigue aumentando, y ofrece la ventaja añadida de poder ser aplicada a muestras biológicas pequeñas como es el caso de la CGO, o macrófagos alveolares de rata y humanos (Tabraue *et al.*, manuscrito en preparación).

Los resultados (**Figura 3.1**) muestran que el tratamiento con IL1 $\beta$  (30 ng/ml) induce un aumento en la acumulación de nitritos y en la actividad catalítica de NOS medida en términos de la capacidad de conversión de [<sup>3</sup>H]arginina ( $\sim 2 \times 10^6$  dpm/nmol) en citrulina, siendo ambos efectos contrarrestados por la presencia simultánea de L-NAME (2.5 mM) un



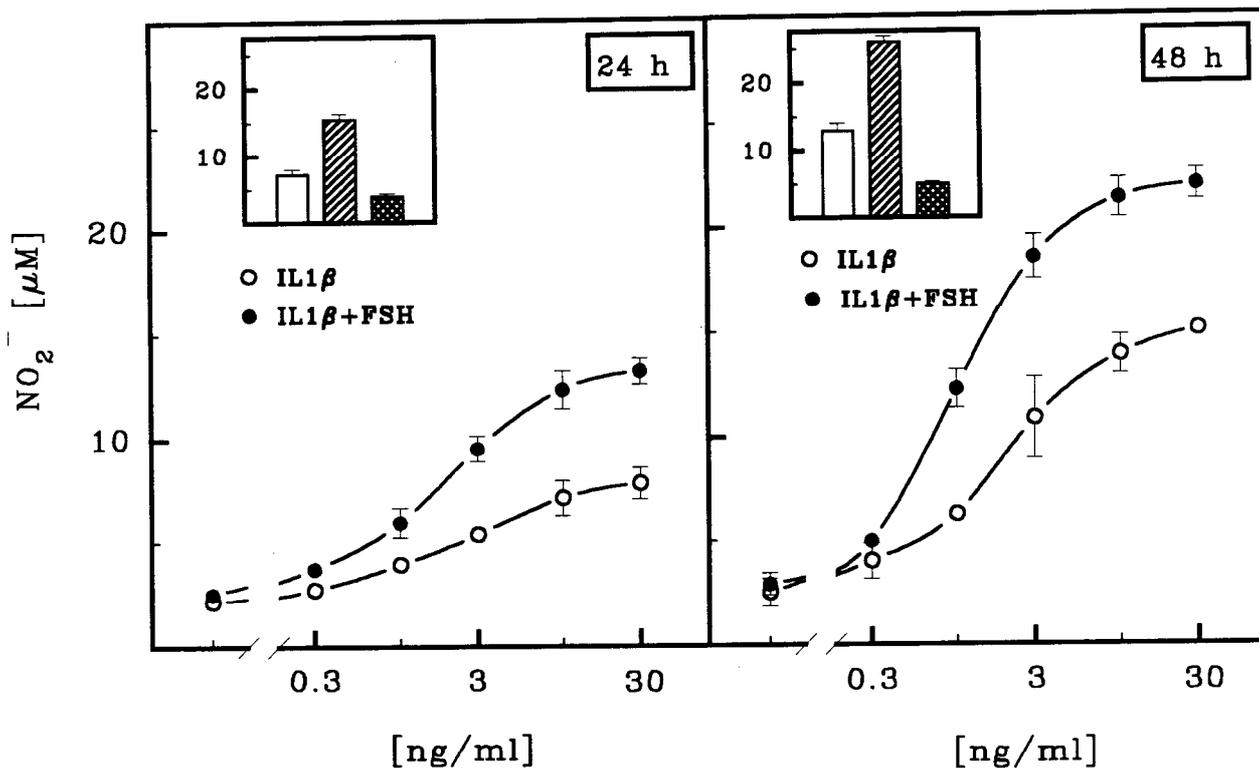
**Figura 3.1. Efecto del tratamiento con IL1 $\beta$  y FSH sobre la actividad de óxido nítrico sintasa en célula granulosa ovárica.**

Las células obtenidas como se detalla en Material y Métodos se cultivaron ( $\sim 10^6$  células/pozo) durante tiempos variables (6-72 h) sin tratamiento (C: controles), solamente con FSH (200 ng/ml), o con IL1 $\beta$  (30 ng/ml) sola ( $\circ$ - $\circ$ ) o en combinación con la gonadotropina ( $\square$ - $\square$ ). Para demostrar la especificidad del efecto, ambos grupos experimentales se cultivaron también en presencia del inhibidor L-NAME ( $\bullet$ - $\bullet$ ,  $\blacksquare$ - $\blacksquare$ ). El panel inserto muestra el efecto del tratamiento durante 48 h con 0.5 mM de but<sub>2</sub>cAMP solo (barras abiertas) o en presencia de 10 ng/ml de IL1 $\beta$  (barras sombreadas). En los mismos experimentos las células (triplicados o cuadruplicados) se cultivaron durante dos días con dosis crecientes de IL1 $\beta$  (0.3-30 ng/ml). Los resultados (media  $\pm$  SEM) son representativos de tres/cuatro pocillos/tratamiento y el experimento se repitió tres veces con idénticos resultados.

análogo de la arginina ampliamente utilizado para inhibir de forma competitiva e inespecífica todas las formas moleculares de la NOS (Ogden & Moore, 1995).

Aunque la FSH por sí misma no tuvo ningún efecto sobre la acumulación de nitritos o actividad enzimática directa del enzima, en células tratadas simultáneamente con la gonadotropina se observó un aumento de la actividad de iNOS, efecto que ya fue aparente a las 12 horas de cotratamiento y a todos los tiempos posteriores estudiados (**Figura 3.1**, panel superior e inferior). La concentración de nitritos en el medio, que refleja la actividad acumulativa de la vía a lo largo de todo el periodo experimental, continuó aumentando a lo largo de los tres días que duró el experimento, mientras que la determinación en las mismas células de la capacidad para convertir [<sup>3</sup>H]arginina en [<sup>3</sup>H]citrulina usada como índice de la actividad NOS a un tiempo dado, alcanzó el máximo valor a las 48h de tratamiento independientemente de que las células estuvieran estimuladas con IL1 $\beta$  sola o en presencia de FSH. Como puede observarse (**Figura 3.2**) estos resultados se confirmaron en experimentos adicionales donde el efecto de dosis diferentes de IL1 $\beta$  sobre la generación de NO es amplificado por una sola dosis de FSH tanto a las 24 horas como a las 48 horas de tratamiento.

La FSH activa un receptor de 7DTM acoplado via proteínas Gs a la adenilato ciclasa (McFarland *et al.*, 1989; Heckert *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1991 y 1992), que aumenta los niveles intracelulares de cAMP y activa proteína quinasa-A (Richards *et al.*, 1994). La activación de la vía cAMP-PKA por estimulación directa de la adenilato ciclasa con Forskolin, o el tratamiento con análogos permeables del cAMP que libera las subunidades catalíticas de PKA, reproduce los efectos de la hormona sobre la esteroidogénesis y diferenciación morfológica de estas células (Amsterdam *et al.*, 1989). Como puede observarse en experimentos paralelos (mostrados en los recuadros de las mismas **Figuras 3.1** y **3.2**) los efectos de un análogo permeable del cAMP sobre la actividad catalítica de NOS y producción de especies oxidadas del nitrógeno reproduce los efectos observados anteriormente para la FSH, confirmando así el efecto potenciador de la vía cAMP-PKA en este fenómeno.



**Figura 3.2. La generación de NO inducida por  $\text{IL1}\beta$  y FSH es dependiente de la dosis y del tiempo de incubación en célula granulosa ovárica.**

Las células ( $\sim 10^6$  células/pozo) se trataron durante los tiempos que se indican (24 h: panel superior; 48 h: panel inferior) en presencia de dosis crecientes de  $\text{IL1}\beta$  (0.3-30 ng/ml) sola ( $\circ-\circ$ ) o en combinación con FSH ( $\bullet-\bullet$ ), y la acumulación de nitritos se determinó en todos los casos espectrofotométricamente como se detalló en la sección correspondiente de Material y Métodos. Para demostrar la especificidad del efecto a ambos tiempos, las células se cultivaron en presencia de 10 ng/ml de  $\text{IL1}\beta$  sola (barras blancas) o en combinación con 0.5 mM de  $\text{but}_2\text{cAMP}$  solo (barras cruzado simple) o en presencia del inhibidor L-NAME (barra cruzada doble). Los resultados (media  $\pm$  SEM) son representativos de tres/cuatro pocillos/tratamiento y el experimento se repitió tres veces con idénticos resultados.

**3.2. Análisis por RT-PCR y Western-blott de los efectos amplificadores de la FSH sobre la actividad NOS en células granulosa ováricas.** En los siguientes experimentos nos planteamos investigar el posible mecanismo por el que la activación de la vía FSH-cAMP-PKA potencia los efectos de la IL1 $\beta$  sobre la actividad NOS en célula granulosa ovárica.

Aunque las diferentes isoformas de NOS difieren en sus características moleculares y distribución tisular, todas las especies moleculares estudiadas utilizan una misma cohorte de coenzimas (**Figura 1.3**) que incluyen al NADPH, FAD y FMN (Mayer *et al.*, 1990; Stueher *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1992; Pollock *et al.*, 1993) y sólo se diferencian entre sí por la forma en que se expresan y/o por su aparente dependencia de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina como cofactor necesario para inducir la máxima actividad catalítica (Tayeh & Marletta, 1989; Bredt & Snyder, 1990; Mayer *et al.*, 1990).

Sin embargo, aunque se sabe que el NADPH, FAD y FMN participan de forma estequiométrica durante la generación de NO (Stuher, 1997), el papel del BH<sub>4</sub> en la reacción es diferente y no se transforma en BH<sub>2</sub> durante el proceso catalítico (Mayer *et al.*, 1990 y 1991; Gross *et al.*, 1991 Gross & Levi, 1992). Hoy se sabe que la formación de homodímeros antiparalelos de NOS, es importante para mantener la conformación del centro activo del enzima (Baek *et al.*, 1993; Klatt *et al.*, 1995), y que este cofactor juega un papel importante en la estabilización de la estructura dimérica de la NOS (Mayer *et al.*, 1990 y 1991; Baek *et al.*, 1993; Hevel & Marletta, 1992).

Para mantener la actividad de las isoformas constitutivas de NOS, los niveles de BH<sub>4</sub> celulares son suficientes para formar el estado dimérico con las pocas copias del enzima presentes en la célula (Stueher, 1997). Sin embargo la inducción de iNOS por LPS y citoquinas es normalmente precedida por la síntesis de nuevas moléculas de BH<sub>4</sub> necesarias para formar dímeros activos con el elevado número de moléculas del enzima que se están produciendo *de novo* (Nathan, 1992; Gross & Levi, 1992; Stuher, 1997).

El uso de agentes farmacológicos para inhibir la biosíntesis del cofactor y la medida

de BH<sub>4</sub> intracelular, han demostrado el absoluto requerimiento del mismo para una óptima generación de NO en células de mamífero (Gross & Levi, 1992). La biosíntesis de BH<sub>4</sub> se inicia por la vía *de novo* a partir del GTP que se convierte en 7,8-dihidroneopterina trifosfato por la acción de la GTP-ciclohidrolasa (EC 3.5.4.16) el enzima limitante de la vía (Nichol *et al.*, 1985) que se induce de forma rápida en respuesta a los mismos estímulos que inducen iNOS (Werner *et al.*, 1993; Werner-Felmeyer *et al.*, 1993; Hattori & Gross, 1993; Scott-Burden *et al.*, 1993).

Puesto que los resultados anteriores demuestran que la generación temporal de NO inducida por IL1 $\beta$  aumenta cuando se estimula simultáneamente la vía FSH-cAMP, en los siguientes experimentos nos planteamos determinar el posible mecanismo implicado en este fenómeno, estudiando el efecto de ambos agonistas sobre la transcripción de iNOS y GTPCH.

En otro orden de cosas, y aunque el cultivo de CGO obtenida de ratas inmaduras tratadas con estrógenos ha sido un modelo ampliamente utilizado para el estudio del importante proceso de diferenciación de estas células (Hsueh, 1984), el bajo número de células que pueden obtenerse por cada ovario representa una seria dificultad para el estudio de procesos celulares en términos moleculares (Park & Mayo, 1991). Para obviar esta dificultad que impone la poca cantidad de mRNA que puede obtenerse de estos cultivos, se han validado recientemente métodos para el estudio de la expresión génica por RT-PCR usando en la fase de amplificación nucleótidos marcados con <sup>32</sup>Pi (Park & Mayo, 1991; Orly *et al.*, 1994).

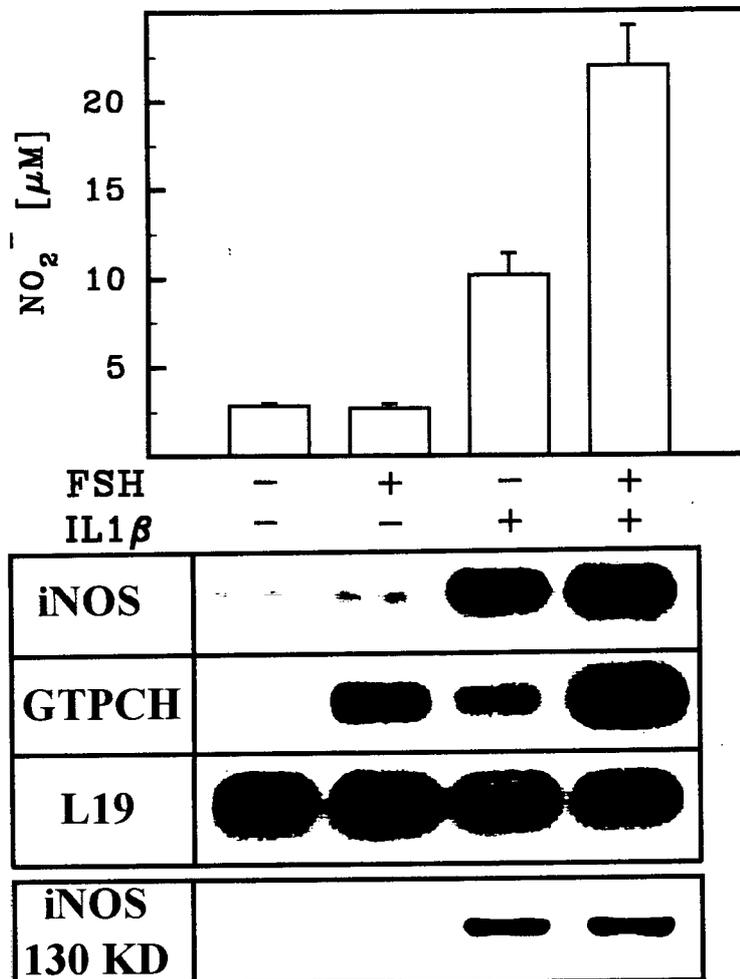
En el presente trabajo, y tal y como se indicó en la sección de Material y Métodos (**Figura 2.3**) se ha utilizado esta técnica validada en nuestro laboratorio (Santana *et al.*, 1996) para la determinación cuantitativa de la expresión de los genes a estudiar, pero usando un método basado en la amplificación de los cDNAs con cebadores específicos (ver **Tablas II y III y Figura 2.7**) y DIG-11-dUTP (Su *et al.*, 1994) para la detección de los productos amplificados por quimioluminiscencia.

En experimentos paralelos y para estudiar la especificidad del fenómeno, se extrajeron las proteínas totales de los diferentes grupos experimentales que se separaron (40  $\mu\text{g}$ /tratamiento) por SDS-PAGE, transfiriéndose luego a membranas de nitrocelulosa que se incubaron con un anticuerpo generado frente a la iNOS de macrófagos murinos, y a la dilución final recomendada por el fabricante (1:2,500).

Tal y como puede observarse en el panel superior de la **Figura 3.3**, de nuevo el tratamiento con FSH aumentó los niveles de nitritos acumulados en el medio de cultivo por las células tratadas con IL1 $\beta$  (panel superior) y al analizar la expresión con el anticuerpo específico de la forma inducible (iNOS) del enzima (panel inferior la misma figura) o los niveles de mRNA de iNOS y GTPCH (panel intermedio), aparecen resultados aparentemente paradójicos. Puede observarse en primer lugar que los niveles indetectables de la proteína (130 kDa) en células control aumentan después del tratamiento con IL1 $\beta$ , pero aunque la acumulación de NO $_2^-$  y los niveles de mRNA de iNOS aumentan en células sometidas a tratamiento conjunto con IL1 $\beta$  y FSH, la señal correspondiente a la NOS permanece constante. Estos resultados son interpretables en términos de un efecto de la vía FSH-cAMP-PKA sobre la estabilidad mRNA de iNOS, más que a un aumento de la transcripción (**Figura 3.3**) que en ningún caso se correlaciona con aumentos en la traducción del mRNA a proteína.

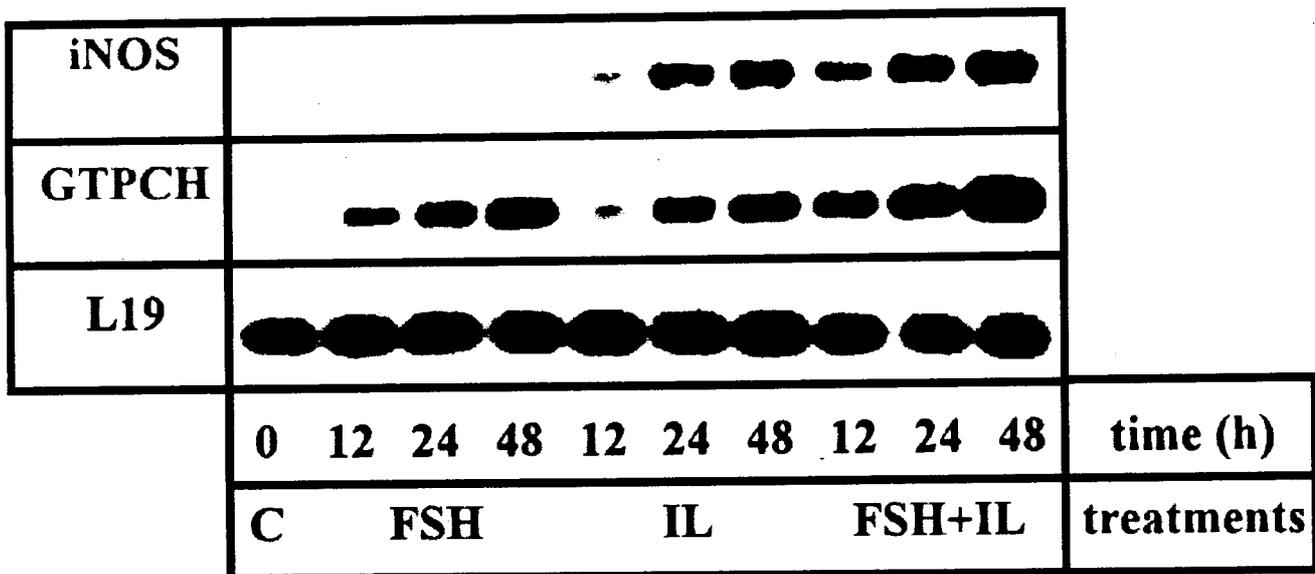
Más importante es el efecto que puede observarse en la misma **Figura 3.3** que muestra como hay un aumento mas que aditivo en los niveles de mRNA de la GTPCH en células estimuladas simultaneamente con IL1 $\beta$  y FSH, y que es particularmente llamativos en el experimento que se resume en la **Figura 3.4**, y que demuestra la inducción dependiente del tiempo de los mRNA de GTPCH e iNOS. Aunque no se incluyen los resultados obtenidos para la acumulación de nitritos o actividad del enzima pues son superponibles a los de la **Figura 3.1.**, es particularmente interesante el efecto potenciador de ambos tratamientos a las 12 h de estimulación.

En su conjunto, estos resultados sugieren que la activación de la vía FSH-cAMP al



**Figura 3.3. Análisis por RT-PCR e inmunoblott de los efectos de la IL1 $\beta$  y FSH sobre la actividad NOS en células granulosa ovárica.**

Las células ( $\sim 10^6$  células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante 48 h en presencia de IL1 $\beta$  (30 ng/ml) sola o en combinación con FSH (200 ng/ml). Los nitritos se determinaron espectrofotométricamente a 548 nm (en el panel superior se muestra la media de los dos experimentos). Las células se lisaron y las proteínas se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa e incubaron en presencia del anticuerpo de iNOS (dilución final 1:2,500) y la proteína se detectó por quimioluminiscencia tal y como se describió en Material y Métodos (panel intermedio). De forma análoga el análisis por RT-PCR se realizó a partir de RNA total que se retrotranscribió a cDNA y amplificó con los cebadores descritos en Material y Métodos (panel inferior). En el panel superior se muestran los resultados (media  $\pm$  SEM) de los dos experimentos. Resultados similares de expresión de la proteína y niveles de mRNA se obtuvieron en otros tres experimentos.



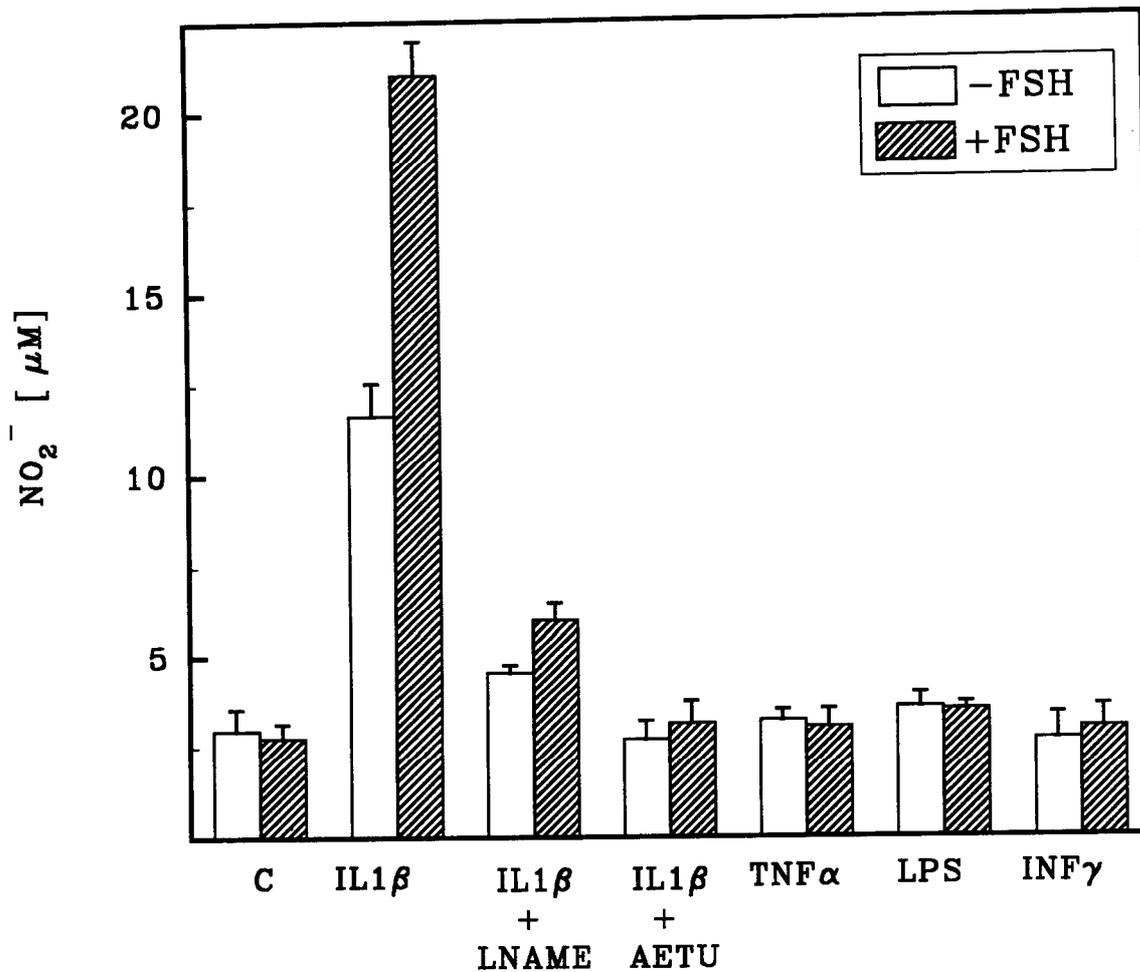
**Figura 3.4.** *Análisis por RT-PCR de la expresión del mRNA de iNOS y GTPCH en células granulosa tratadas durante tiempos variables con IL1 $\beta$  y FSH.* Las células ( $\sim 10^6$  células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante los tiempos variables que se indican (12-48 h) en presencia de IL1 $\beta$  (30 ng/ml) sola o en combinación con FSH (200 ng/ml), y el RNA se extrajo y analizó por RT-PCR con los cebadores descritos en Material y Métodos. Los resultados para la acumulación de nitritos y actividad iNOS de este experimento no se muestran, pero fueron idénticos a los obtenidos en la Figura 3.1.

potenciar los efectos de la IL1 $\beta$  sobre la generación de BH4 intracelular, promueve niveles de cofactor superiores y capaces de activar todas las moléculas de NOS cuya síntesis se debe exclusivamente a la acción de la citoquina.

**3.3. El efecto de la IL1 $\beta$  sobre la actividad NOS y producción de NO es específico y no es observado con otros agonistas.** El TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y otras citoquinas son capaces de activar la vía del óxido nítrico en diferentes tipos de células (Sthuer & Marletta, 1985 y 1987; Moncada *et al.*, 1991; Nathan *et al.*, 1992). Puesto que estos productos de secreción de monocitos/macrófagos también inducen respuestas celulares que modulan la función de las CGO y células tecaes del folículo ovárico, en los siguientes experimentos se evaluó el posible efecto de estos agonistas sobre la actividad NOS en el modelo de CGO mantenida en cultivo primario, incluyendo en estos experimentos el tratamiento con LPS, un potente estimulador de la NOS en macrófagos y otros tipos celulares, para el que ha sido recientemente demostrada la existencia de receptores específicos en CGO (Sancho-Tello *et al.*, 1992).

Las células se trataron durante tiempos y a dosis diferentes con los agonistas que se indican en la **Figura 3.5**, en la que solo se muestra la dosis más alta representativa de cada experimento, y el tiempo máximo de 72 horas que debe resultar en una acumulación máxima de NO $_2^-$  en el medio de incubación (**Figura 3.1**). Como puede apreciarse, independientemente de la dosis o la presencia simultánea de FSH (200 ng/ml) sólo se observa un aumento en la actividad NOS medida en función de la acumulación de especies oxidadas en el medio, en los grupos experimentales tratados con IL1 $\beta$  sólo o en presencia de la gonadotropina. Al considerarlos en su conjunto, los resultados del experimento descrito (**Figura 3.5**) y los ya discutidos previamente (**Figuras 3.1 y 3.2**) apoyan/sugieren la hipótesis que aunque la CGO pueda no ser la única fuente de NO en el ovario, su contribución es al menos importante.

Esta afirmación puede hacerse independientemente de experimentos previos realizados con células granulosa purificadas donde aparentemente no había respuesta a la IL1 $\beta$  si no era en presencia de células tecaes en el cultivo (Elffman *et al.*, 1993; Ben-Schlomo *et al.*, 1994a



**Figura 3.5. Especificidad de la IL1β como estimuladora de la actividad NOS en célula granulosa ovárica.**

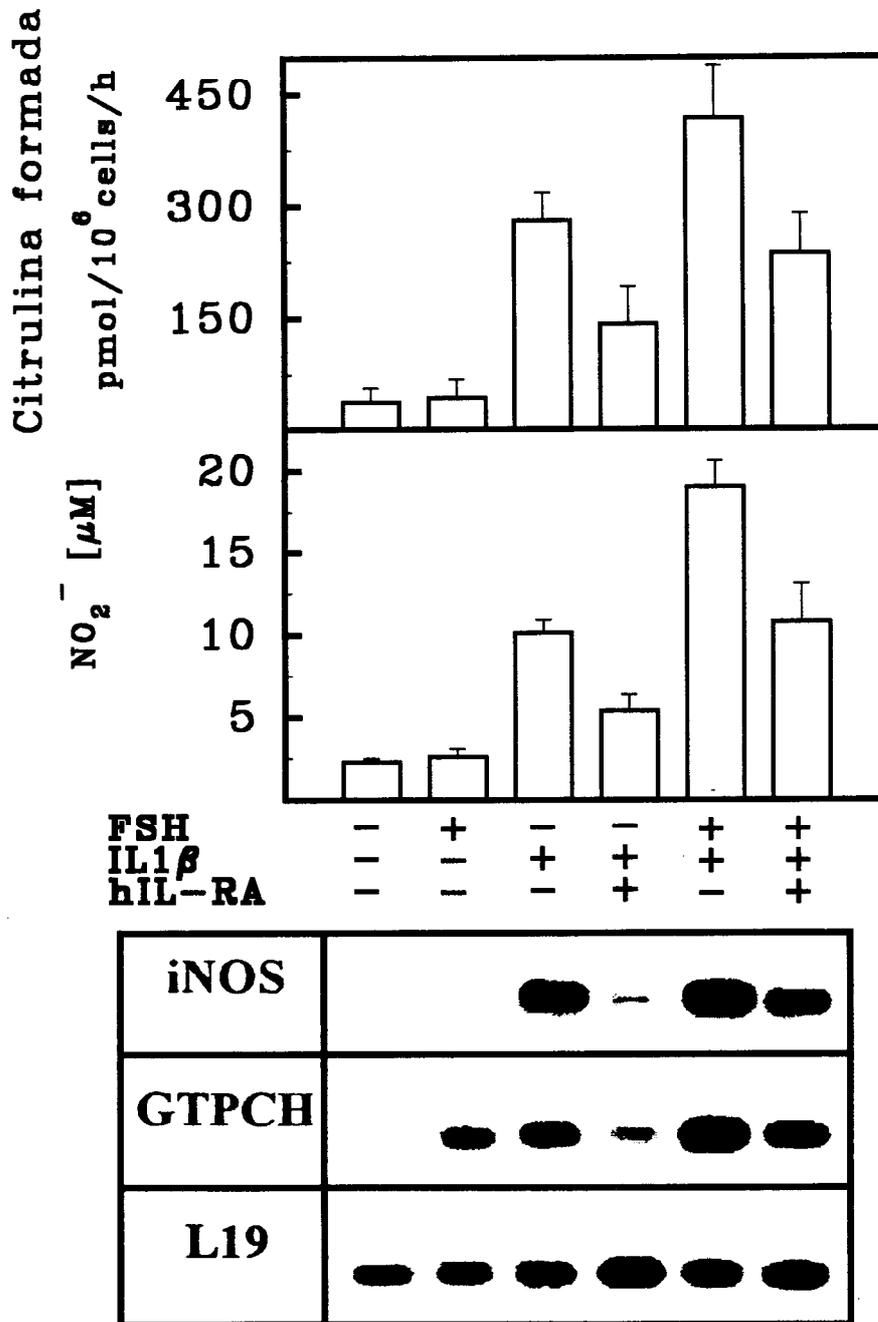
Las células ( $\sim 10^6$  células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante 72 h en presencia de IL1β (30 ng/ml), LPS (200 ng/ml), TNFα (30 ng/ml) e IFNγ solas o en combinación con FSH (200 ng/ml). La acumulación de nitritos se determinó espectrofotométricamente a 548 nm (panel superior) y la actividad del enzima en términos de [ $^3\text{H}$ ]citrulina formada durante cuatro horas (panel inferior) se determinó por cuadruplicado en todos los casos, y resultados similares (media  $\pm$  SEM) se obtuvieron en otros tres experimentos. Los efectos de la IL1β sola o en presencia de FSH se estudian en este experimento en presencia de dos diferentes inhibidores de NOS: L-NAME (2.5 mM) y AETU (10  $\mu\text{M}$ ) un inhibidor más específico de las formas inducibles de iNOS.

y 1994b). Los resultados presentados hasta el momento, descartan esta posibilidad planteada por otros laboratorios (Elffman *et al.*, 1993; Ben-Schlomo *et al.*, 1994a y 1994b), y aunque en el cultivo primario utilizado por nosotros no pueda descartarse del todo una contaminación con células de la teca/intersticio, éstas no tienen receptores a la FSH (Hsueh *et al.*, 1994) y por tanto no habría explicación plausible al efecto potenciador de esta gonadotropina que mostramos en estos experimentos (**Figuras 3.1-3.3**).

La especificidad del efecto de la IL1 $\beta$ , se muestra en un experimento adicional resumido en la **Figura 3.6**, y en el que células tratadas con IL1 $\beta$  sola o en presencia de FSH son cultivadas además con la proteína (ILRA) antagonista del receptor de interleuquina (ILRA) humana (Dinarello & Thompson, 1991). Tal y como puede observarse, el tratamiento con ILRA antagoniza parcialmente la actividad iNOS (medida en términos de acumulación de NO $_2^-$  y [ $^3$ H]citrulina) independientemente de la presencia de FSH (panel superior). Los efectos observados con el ILRA sobre la actividad enzimática son además coherentes con el descenso observado en los mismos experimentos del mRNA de iNOS y GTPCH, que discutiremos a continuación.

**3.4. Papel de la biosíntesis de BH4 por la vía "de novo" y de salvamento sobre la actividad enzimática de iNOS en célula granulosa ovárica.** En los diferentes experimentos presentados hasta ahora, se demuestra que el tratamiento con FSH potencia los efectos de la IL1 $\beta$  sobre la actividad NOS por un mecanismo que, tal y como puede deducirse de los experimentos de RT-PCR, pueden atribuirse, en principio, a un aumento de la expresión del mRNA de GTPCH, el enzima limitante para la biosíntesis *de novo* del cofactor (Nichol *et al.*, 1995). Los aumentos del mRNA del enzima, se correlacionan con un incremento de la concentración de BH4 intracelular (Sthuer *et al.*, 1991a; Baek *et al.*, 1993; Klatt *et al.*, 1995) que probablemente permita la formación de dímeros activos a partir de las nuevas moléculas de iNOS que se están sintetizando en respuesta al tratamiento con IL1 $\beta$  (Hatakeyama *et al.*, 1991; Lui *et al.*, 1993; Hattori & Gross, 1993).

Para verificar esta hipótesis, que ya ha sido considerada como un mecanismo



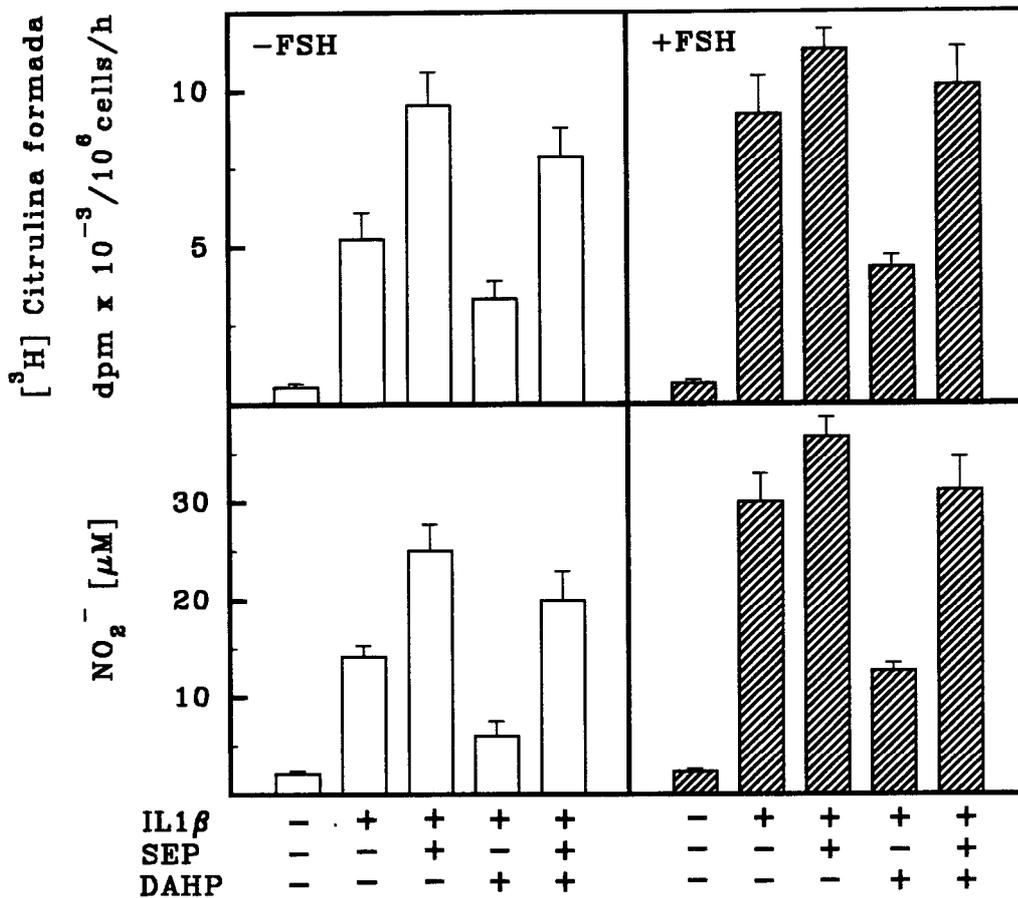
**Figura 3.6. Efecto del antagonista del receptor de IL1β sobre la acumulación de nitritos y expresión del mRNA de iNOS y GTPCH.**

Las células (~10<sup>6</sup> células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante 48 h en presencia de IL1β (30 ng/ml) sola o en combinación con FSH (200 ng/ml) y en presencia y ausencia del ILRA (2.5 μg/ml). Al final del experimento, la acumulación de nitritos se determinó espectrofotométricamente a 548 nm (panel superior) y la formación de [<sup>3</sup>H]citrulina (panel intermedio) por el método radioenzimático descrito en Material y Métodos. Los resultados (media ± SEM) son representativos de dos experimentos adicionales. El análisis por RT-PCR de la GTPCH, NOS y L19 que se incluye como control de amplificación, se realizó a partir de RNA total que se retrotranscribió a cDNA y amplificó con los cebadores descritos en Material y Métodos (panel inferior).

potenciador de la actividad NOS en fibroblastos de ratón (Werner-Felmeyer *et al.*, 1990), músculo liso (Gross & Levi, 1992; Lee *et al.*, 1995) y otros tipos celulares (Werner-Felmeyer *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1991), se diseñaron experimentos específicos para investigar esta posibilidad.

Tal y como detallamos en la introducción de esta memoria, la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) puede sintetizarse no sólo a partir del GTP por la vía *de novo*, cuya etapa limitante es, como ya hemos dicho la isoforma inducible de GTPCH, sino también por una vía alternativa de salvamento, que usa sepiapterina (SEP) como molécula precursora (Werner *et al.*, 1993) que es transformada en BH<sub>4</sub> por el enzima dihidrofolato-reductasa (DHFR) que se expresa constitutivamente bajo condiciones basales en las células de mamífero (Nichol *et al.*, 1985).

Usando los diferentes agentes inhibidores y activadores de la vía, que se señalaron en la sección de Material y Métodos (**Figura 2.2**) podemos observar que inhibiendo selectivamente la GTPCH con DAHP (Werner *et al.*, 1993; Morris & Billiar, 1994), o aumentando la concentración intracelular de BH<sub>4</sub> con el precursor de la vía de salvamento SEP, no se modificaron los niveles basales NO producido por células no estimuladas (**Figura 3.7**). En presencia de IL1 $\beta$  sólo o en combinación con FSH, sin embargo, la actividad de la iNOS disminuyó significativamente al inhibir la vía *de novo* con DHAP, siendo este efecto específicamente revertido en presencia del sustrato de la vía de salvamento alternativa (Werner *et al.*, 1993). El tratamiento con SEP aumentó además la actividad de la vía del NO en células tratadas con IL1 $\beta$  hasta niveles similares a los de los grupos experimentales estimulados simultáneamente con la gonadotropina, hecho que indirectamente apoya la hipótesis de la importancia de los niveles intracelulares de BH<sub>4</sub> para una óptima actividad NOS (Stuher, 1977). Sin embargo, los intentos por reproducir el efecto de la SEP usando directamente BH<sub>2</sub> y BH<sub>4</sub>, que son capaces de atravesar las membranas celulares del tipo celular fueron infructuosos (no se muestran los resultados) probablemente debido a la alta inestabilidad de estos compuestos en las condiciones de cultivo a pH neutro tal y como ha sido descrito en otros modelos experimentales (Gross & Levi, 1992).



**Figura 3.7. La actividad de iNOS es dependiente de BH4 en célula granulosa ovárica.** Las células (~ 10<sup>6</sup> células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante 48 h en presencia de IL1β (30 ng/ml) sola (panel izquierdo) o en combinación con 200 ng/ml de FSH (panel derecho). Las células se trataron además con el precursor de la vía de salvamento SEP (100 μM) o con el inhibidor de la GTPCH, DAHP (3 mM) solos o en las combinaciones que se especifican en los dos paneles. Al final del experimento, la acumulación de nitritos se determinó espectrofotométricamente a 548 nm (panel superior) y la actividad del enzima se representa en el panel inferior. Los resultados (media ± SEM) son representativos de dos experimentos adicionales.

En estos mismos experimentos (Figura 3.7), puede observarse además que el tratamiento con MTX, un potente inhibidor de la dihidrofolato-reductasa (Kaufman *et al.*, 1993) que convierte SEP en BH4 (Nichols *et al.*, 1995) no modificó la acumulación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ni la conversión de [<sup>3</sup>H]arginina en [<sup>3</sup>H]citrulina en células tratadas con IL1β sola o en combinación con FSH, apoyando el hecho de que tanto IL1β como FSH activan exclusivamente la vía *de novo* y no la de salvamento (Nichol *et al.*, 1985).

**3.5. ¿Cual es la función del BH4 sintetizado por la vía "de novo" en célula granulosa ovárica estimulada con FSH ?**. Tal y como hemos apuntado con anterioridad, la GTPCH representa el primer enzima de la vía *de novo* en la biosíntesis de BH4 (Nichols *et al.*, 1985; Werner *et al.*, 1993) y su coinducción por citoquinas y agentes farmacológicos diversos aparece como un fenómeno asociado a la potenciación de la actividad catalítica de la iNOS (Hatakeyama *et al.*, 1991; Hattori & Gross, 1993; Lui *et al.*, 1993).

Aún cuando entre los agentes que potencian la inducción de GTPCH como mecanismo de estimulación de iNOS, se encuentran los activadores de la vía cAMP-PKA (Koide *et al.*, 1991; Hattori & Gross, 1993; Scott-Burden *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1994), esta es la primera vez que se demuestra un efecto similar después de activar un receptor hormonal acoplado a la generación de cAMP. Hasta que se descubrió su papel como coenzima de todas las formas moleculares de NOS (Tayeh & Marletta, 1989; Werner-Felmeyer *et al.*, 1990; Kauffmann, 1993; Baek *et al.*, 1993; Klatt *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995) la función enzimática más conocida de la tetrahidrobiopterina era su participación como coenzima de oxidación-reducción en las reacciones de hidroxilación de aminoácidos involucrados en la biosíntesis de neurotransmisores (Kauffman, 1963 y 1986; Brenneman & Kauffmann, 1964; Lovenberg *et al.*, 1967).

Sin embargo, y tal y como se discutirá en la última parte de esta memoria, empieza a perfilarse un papel regulador de la BH4 en diferentes sistemas biológicos (Werner *et al.*, 1993) en procesos tan diversos como la secreción de neurotransmisores (Koshimura *et al.*, 1990; Ohue *et al.*, 1991; Mataga *et al.*, 1991), proliferación celular (Ziegler *et al.*, 1982 y

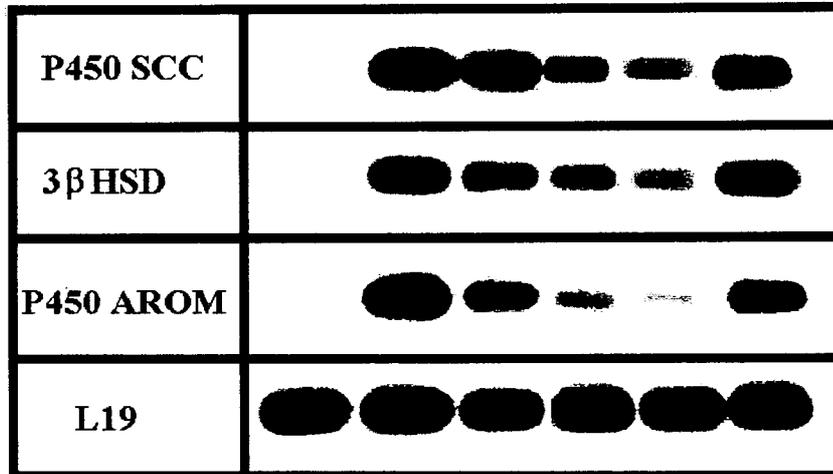
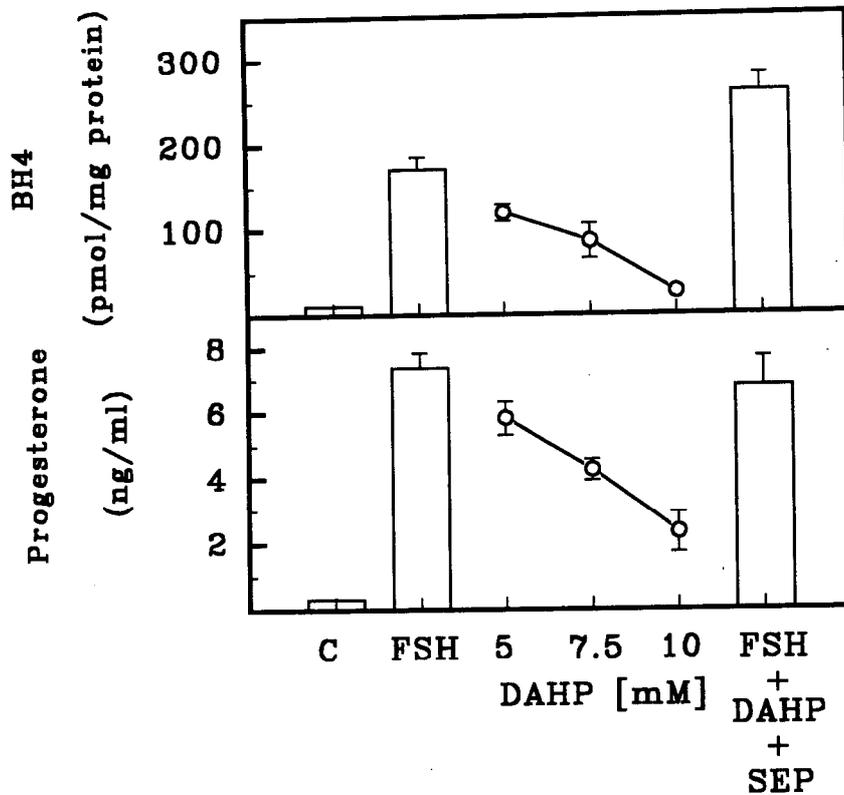
1986; Tanaka *et al.*, 1986; Kerler *et al.*, 1990; Anastasiades *et al.*, 1996) y apoptosis (Baier-Bitterlich *et al.*, 1995; Schobersberger *et al.*, 1996)

Por esta razón, y teniendo en cuenta que la función fundamental de la FSH en el ovario es promover la proliferación y diferenciación hacia el fenotipo esteroideogénico de la CGO (Amsterdam *et al.*, 1989; Richards, 1994), por un proceso que está mediado por la vía cAMP-PKA (Knecht *et al.*, 1981a y 1981b; Ranta *et al.*, 1984; Hedin *et al.*, 1987; Oonk *et al.*, 1989), en los siguientes experimentos nos propusimos investigar dos cuestiones fundamentales : *i*) si los aumentos en la transcripción del enzima inducidos por FSH, se correlacionan con los niveles intracelulares de BH<sub>4</sub> en estas células; y *ii*) en que forma la inducción de GTPCH, y en su caso el aumento intracelular de BH<sub>4</sub> podrían estar implicados en la regulación de la función diferenciada de la CGO, y más concretamente en la regulación de la respuesta esteroideogénica de estas células.

Tal y como puede observarse en la **Figura 3.8** (panel superior), el tratamiento con FSH aumentó la concentración intracelular de BH<sub>4</sub> desde niveles que en las células control estaban prácticamente al límite (<0,01 pmol/mg proteína) de la sensibilidad del método fluorimétrico de detección (**Sección 2.3.5.** y siguientes de Material y Métodos) hasta 200 pmol/mg proteína en células tratadas con FSH, siendo datos coherentes con la demostración previa de un aumento del mRNA de la GTPCH en respuesta a la gonadotropina.

Como era de esperar, la inhibición con DAHP de la GTPCH redujo de forma dosis-dependiente los niveles de BH<sub>4</sub> intracelular acumulados por la vía *de novo*, efecto que pudo revertirse de forma específica usando SEP (100 μM) como sustrato de la vía de salvamento. Menos esperado fué el efecto inducido por el inhibidor de la GTPCH sobre la esteroideogénesis, medida tanto en términos de acumulación de progesterona en el medio de cultivo y actividad de la P450AROM, como de expresión de los enzimas de la esteroideogénesis (panel inferior).

Como cabría esperar, en células tratadas con FSH aumenta tanto la acumulación de



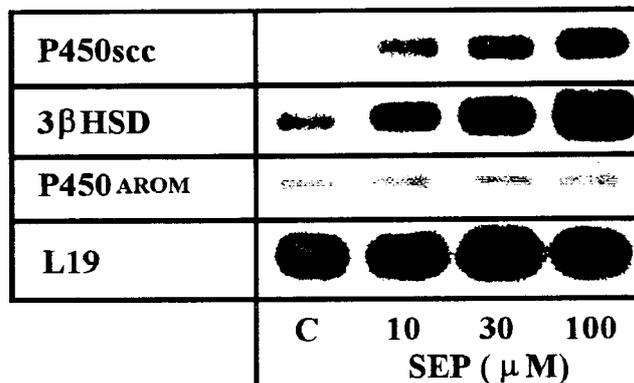
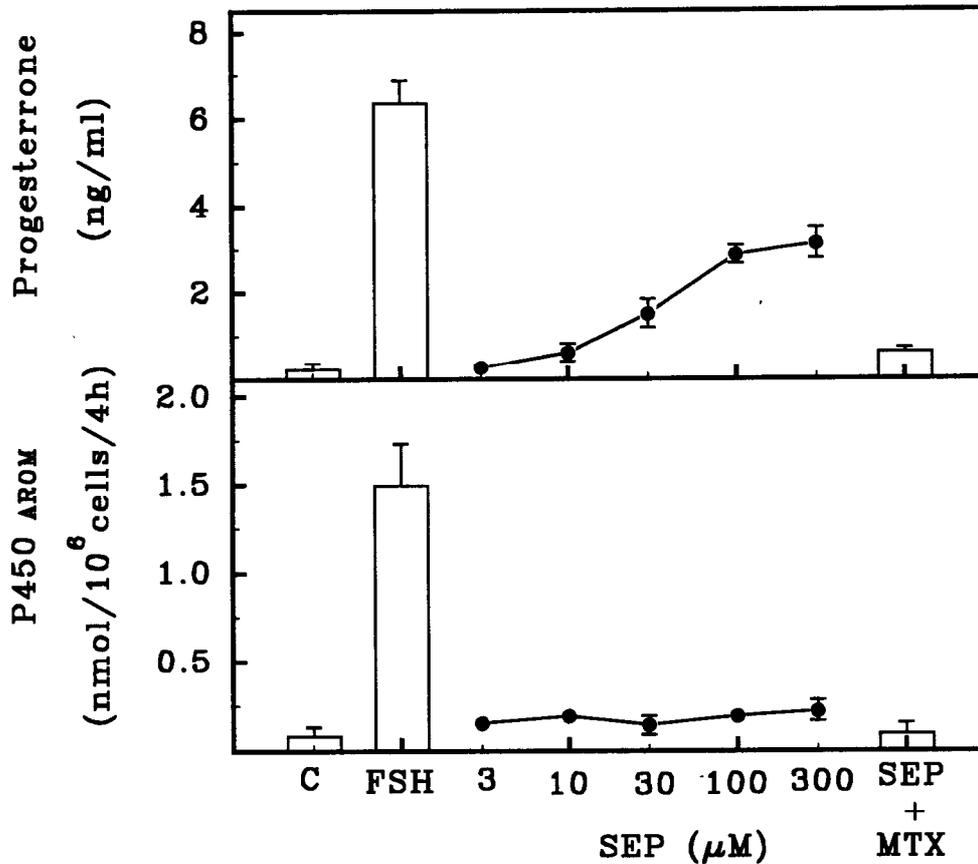
**Figura 3.8. La inhibición de la biosíntesis de BH4 en células tratadas con FSH, juega un papel importante en la esteroidogénesis inducida por la gonadotropina.**

Las células ( $\sim 5 \times 10^6$  células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante 48 h en ausencia (controles) y presencia de 200 ng/ml de FSH sola o en combinación con dosis crecientes de DAHP (5-10 mM). Las células tratadas con FSH y la dosis máxima de DAHP (10 mM) fueron además cultivadas en presencia del sustrato SEP (100  $\mu$ M). Al final del experimento, se determinaron los niveles de BH4 por el método de HPLC descrito en Material y Métodos (panel superior), y la acumulación de progesterona en el medio usando el RIA específico descrito (panel intermedio), resultados (media  $\pm$  SEM) que son representativos de dos experimentos diferentes. El análisis por RT-PCR de los enzimas esteroidogénicos P450scc, 3 $\beta$ HSD, P450AROM y L19 que se incluye como control de amplificación, se realizó a partir de RNA total que se retrotranscribió a cDNA y amplificó con los cebadores descritos en Material y Métodos (panel inferior).

progesterona y la expresión de los enzimas P450scc (McMasters *et al.*, 1987; Oonk *et al.*, 1989) y 3βHSD (Martel *et al.*, 1990; Simpson *et al.*, 1992) implicados en su biosíntesis, como la expresión y actividad (por claridad no se muestran los resultados) de la P450AROM responsable de la conversión de andrógenos en estrógenos (Miller, 1988; Nebert & Nelsom, 1989; Picardo-Leonard & Miller, 1990). Sorprendentemente, el tratamiento con DHAP contrarrestó de forma dosis dependiente la esteroidogénesis inducida por FSH y, lo que es más interesante, este efecto fue revertido de forma específica después del tratamiento con SEP (100 μM).

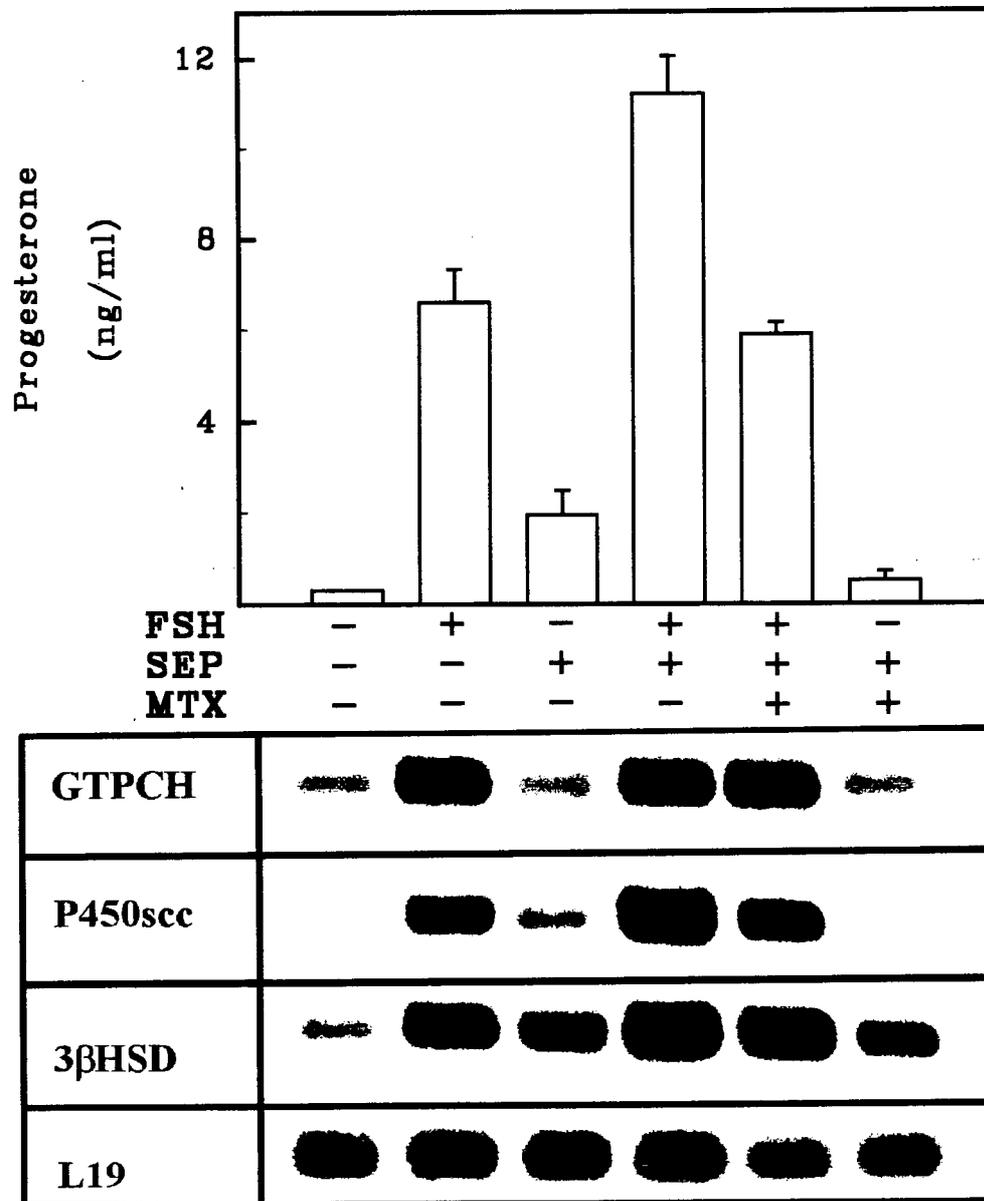
Como puede observarse en experimentos paralelos resumidos en la **Figura 3.9**, se estudió también el efecto directo de los aumentos intracelulares de BH<sub>4</sub> sobre la biosíntesis de progesterona y estrógenos en CGO. En estos experimentos queda claramente demostrado que al aumentar la tetrahidrobiopterina intracelular cultivando las células con dosis crecientes de SEP, también aumenta la biosíntesis de progesterona, que llega a alcanzar casi el 50% de los niveles acumulados por las células tratadas con FSH. Se incluye en el mismo experimento el tratamiento simultáneo con MTX que inhibe la conversión de SEP en BH<sub>4</sub> y, consecuentemente, revierte los efectos del precursor sobre la esteroidogénesis. Aunque los aumentos de progesterona en células tratadas con SEP se correlacionan con incrementos en el mRNA de P450scc y 3βHSD, ni la actividad de la P450AROM implicada en la biosíntesis de estrógenos (Miller, 1988; Nebert & Nelsom, 1989; Picardo-Leonard & Miller, 1990) ni los niveles de su mRNA se inducen al aumentar los niveles intracelulares de SEP.

La especificidad de estos resultados se verificaron en los experimentos resumidos en la **Figura 3.10** y más adelante en la **Figura 3.11**, que de forma resumida demuestran de nuevo los efectos de la SEP sobre la esteroidogénesis basal y en presencia de FSH (**Figura 3.10**) o del análogo permeable but<sub>2</sub>cAMP para activar directamente PKA (**Figura 3.11**). Aunque el efecto inducido por FSH sobre la transcripción de GTPCH no se ve afectado por la presencia de SEP sola o en combinación con MTX (**Figura 3.10**), la actividad esteroidogénica, medida en términos de acumulación de progesterona y transcripción de los correspondientes enzimas P450scc y 3βHSD (McMasters *et al.*, 1987; Oonk *et al.*, 1989;



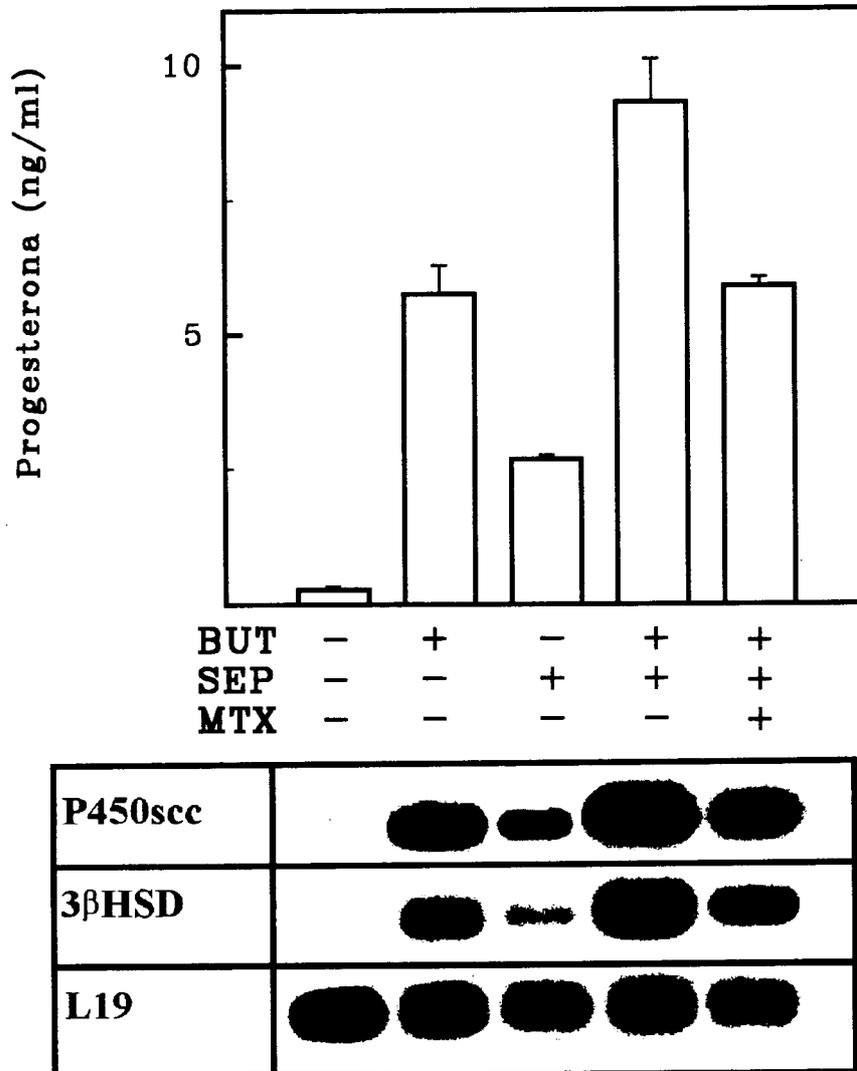
**Figura 3.9. La acumulación de BH4 regula la expresión de los enzimas de la biosíntesis de progesterona en células granulosa.**

Las células (~10<sup>6</sup> células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante 48 h con FSH (200 ng/ml) sola o en presencia de dosis crecientes de SEP (3-300 μM). Se incluyó además un grupo de células tratadas con 100 μM de SEP que se incubó en presencia de MTX (50 μM). Al final del experimento, se determinó la acumulación de progesterona por RIA (panel superior), la actividad enzimática P450AROM y se analizaron por RT-PCR los niveles de expresión de los enzimas esteroidogénicos incluyéndose como en experimentos anteriores la L19 como control de amplificación. El experimento se realizó a partir de RNA total que se retrotranscribió a cDNA y amplificó con los cebadores descritos en Material y Métodos. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos diferentes.



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

**Figura 3.10.** *El aumento de la concentración intracelular de BH4 es suficiente para regular la expresión de los enzimas implicados en la biosíntesis de progesterona en célula granulosa ovárica.* Las células (~10<sup>6</sup> células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante 72 h con FSH (200 ng/ml), SEP (100 μM) y combinación de ambas solas o en presencia de MTX (10 μM) para inhibir la DHFR. Al final del experimento se determinaron los niveles de progesterona acumulada en el medio (panel superior). En experimentos paralelos se extrajo el RNA total y se realizó el análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de P450scc y 3βHSD, incluyéndose como en experimentos anteriores la L19 como control de amplificación. El experimento se realizó a partir de RNA total que se retrotranscribió a cDNA y se amplificó con los cebadores descritos en Material y Métodos. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos diferentes.



**Figura 3.11. Usando metotrexato para inhibir la dihidrofolato reductasa se antagonizan los efectos de la sepiaterina sobre la esteroidogenesis en célula granulosa ovárica.** Las células ( $\sim 10^6$  células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante 72 h con but<sub>2</sub>cAMP (1 mM) y SEP (100  $\mu$ M) solas, en combinación y en presencia del inhibidor de la dihidrofolato reductasa MTX (10  $\mu$ M). Al final del experimento, se determinó la progesterona acumulada en el medio (panel intermedio) o la actividad del enzima P450scc (panel inferior). En experimentos paralelos se extrajo el RNA total y se realizó el analisis por RT-PCR de los niveles de expresión de P450scc, 3βHSD y P450arom, incluyéndose como en experimentos anteriores la L19 como control de amplificación. El experimento se realizó a partir de RNA total que se retrotranscribió a cDNA y se amplificó con los cebadores descritos en Material y Métodos. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos diferentes.

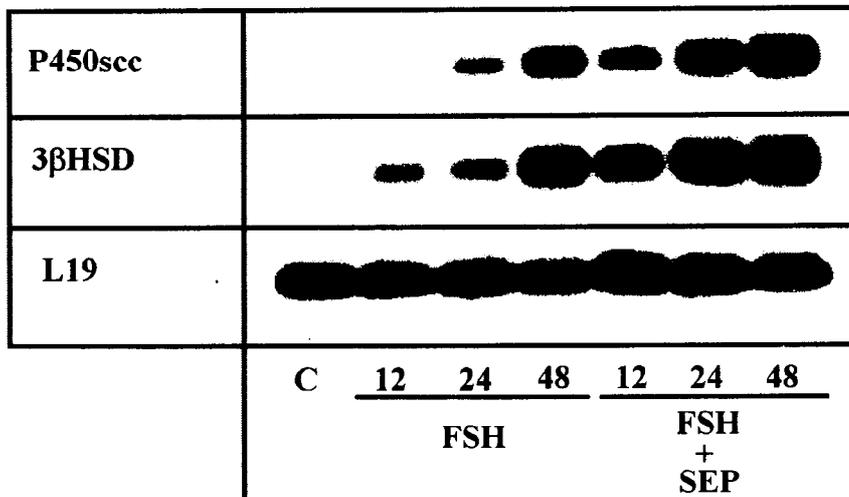
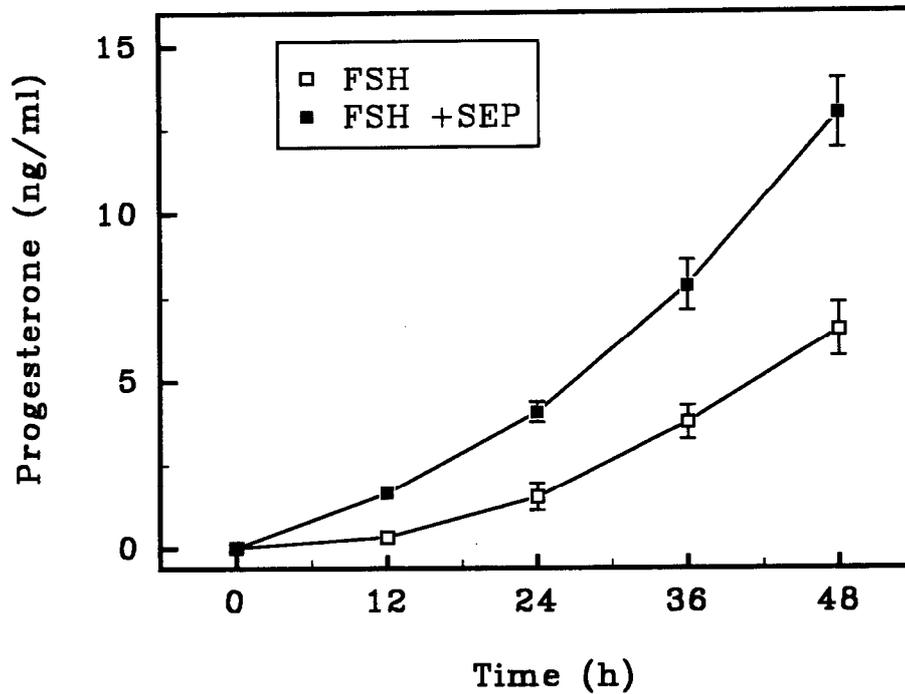
Martel *et al.*, 1990; Simpson *et al.*, 1992) aumentó con el precursor de la vía de salvamento de forma independiente de la presencia de FSH o but<sub>2</sub>cAMP y en todos los casos fue específicamente revertido este efecto con el inhibidor (MTX) de la dihidrofolato reductasa.

De la misma forma, y tal y como se muestra en la **Figura 3.12**, el tratamiento conjunto con sepiapterina y FSH durante tiempos variables (12-48 h) aumenta la actividad esteroidogénica de la CGO medida en términos de acumulación de progesterona pero, lo que es más importante, los resultados de estos experimentos también muestran que el efecto facilitador del BH<sub>4</sub> se traduce en un adelanto en el tiempo en que los niveles de mRNA de P450scc y 3βHSD se hacen aparentes.

Tomados en su conjunto, los resultados anteriores sugieren que el BH<sub>4</sub> intracelular juega un importante papel modulador de la transcripción de la P450AROM solo en células tratadas con FSH siendo al mismo tiempo esta molécula capaz de inducir por sí misma la transcripción de los enzimas P450scc y 3βHSD implicados en la biosíntesis de progesterona.

**3.6. ¿Cuál es el mecanismo de señalización intracelular implicado en la inducción de iNOS por IL1β en célula granulosa ovárica?** El TNFα y la IL1β, son dos citoquinas de idéntico PM (17 Kda) producidas por monocitos/macrófagos y otras células inmunocompetentes que regulan una gran variedad de respuestas biológicas en células normales y transformadas (Beutler & Cerami, 1988; Dinarello, 1988 y 1989; Dinarello & Thomson, 1991; Vilceck & Lee, 1991). Muchas de estas respuestas son comunes a ambas citoquinas, que además activan frecuentemente idénticos mecanismos de señalización intracelular en los que han sido implicadas proteínas G (O'Neill *et al.*, 1990; Yanaga *et al.*, 1992), generación de diacilglicerol y activación de la proteína quinasa C (Rossoff *et al.*, 1988; Schütze *et al.*, 1992).

Puesto que en los resultados previos ya descritos en esta memoria (**Figura 3.5**) habíamos visto que la IL1β era capaz de activar la iNOS, mientras que no se observaba el mismo fenómeno al tratar con TNFα los cultivos de CGO control o estimuladas con FSH,



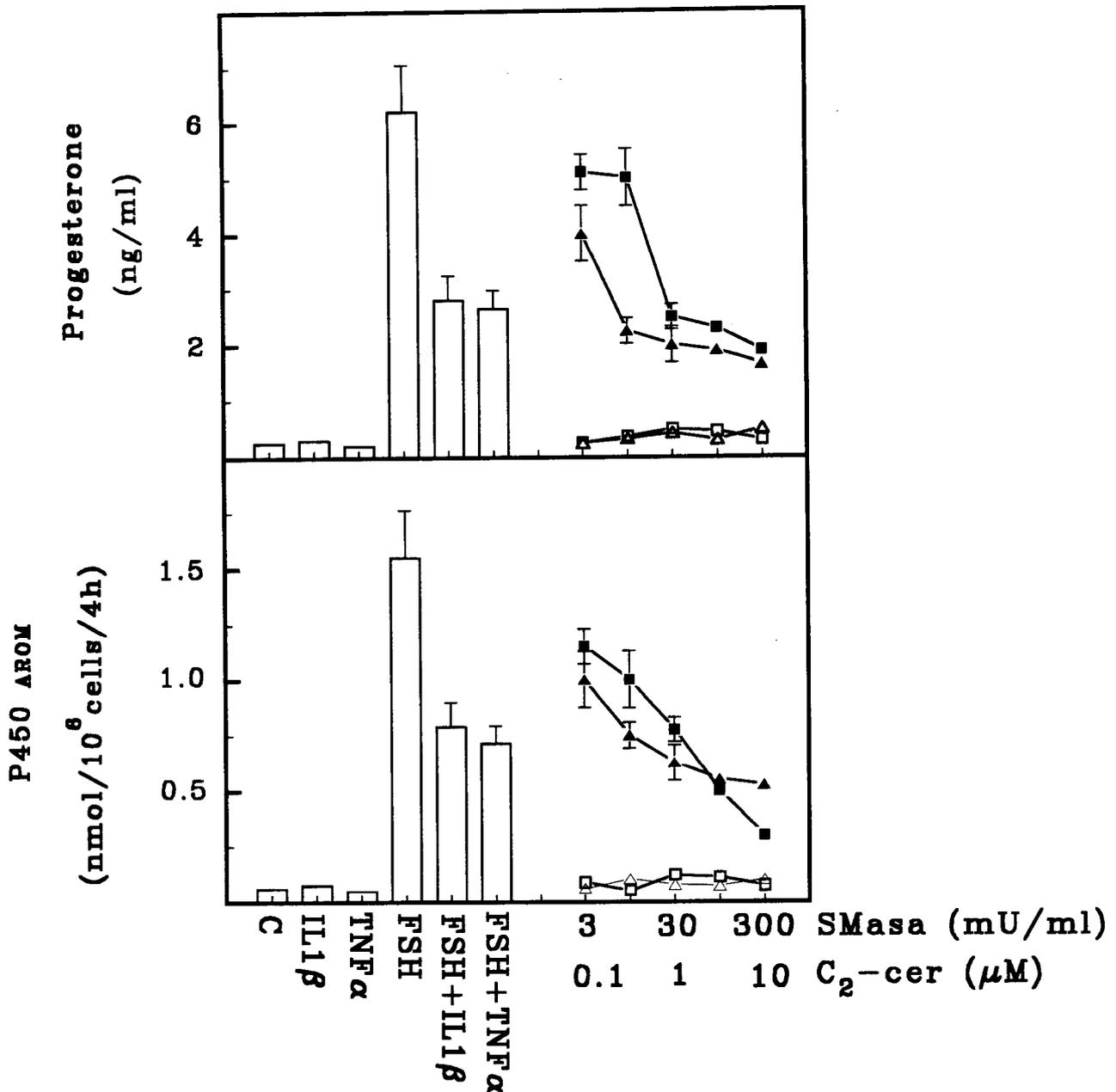
**Figura 3.12.** El aumento de la concentración intracelular de BH4 potencia los efectos de la FSH y adelanta la inducción de los enzimas esteroidogénicos en célula granulosa ovárica. Las células (~ 10<sup>6</sup> células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante 72 h con FSH (200 ng/ml) o con SEP (100 μM). Al final del experimento se determinó la progesterona acumulada en el medio (panel superior). En experimentos paralelos se extrajo el RNA total y se realizó el analisis por RT-PCR de los niveles de expresión de P450scc, 3βHSD y P450arom, incluyéndose como en experimentos anteriores la L19 como control de amplificación. El experimento se realizó a partir de RNA total que se retrotranscribió a cDNA y se amplificó con los cebadores descritos en Material y Métodos. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos diferentes.

en los siguientes experimentos intentamos investigar los mecanismos intracelulares implicados en la regulación de la producción de NO en estas células.

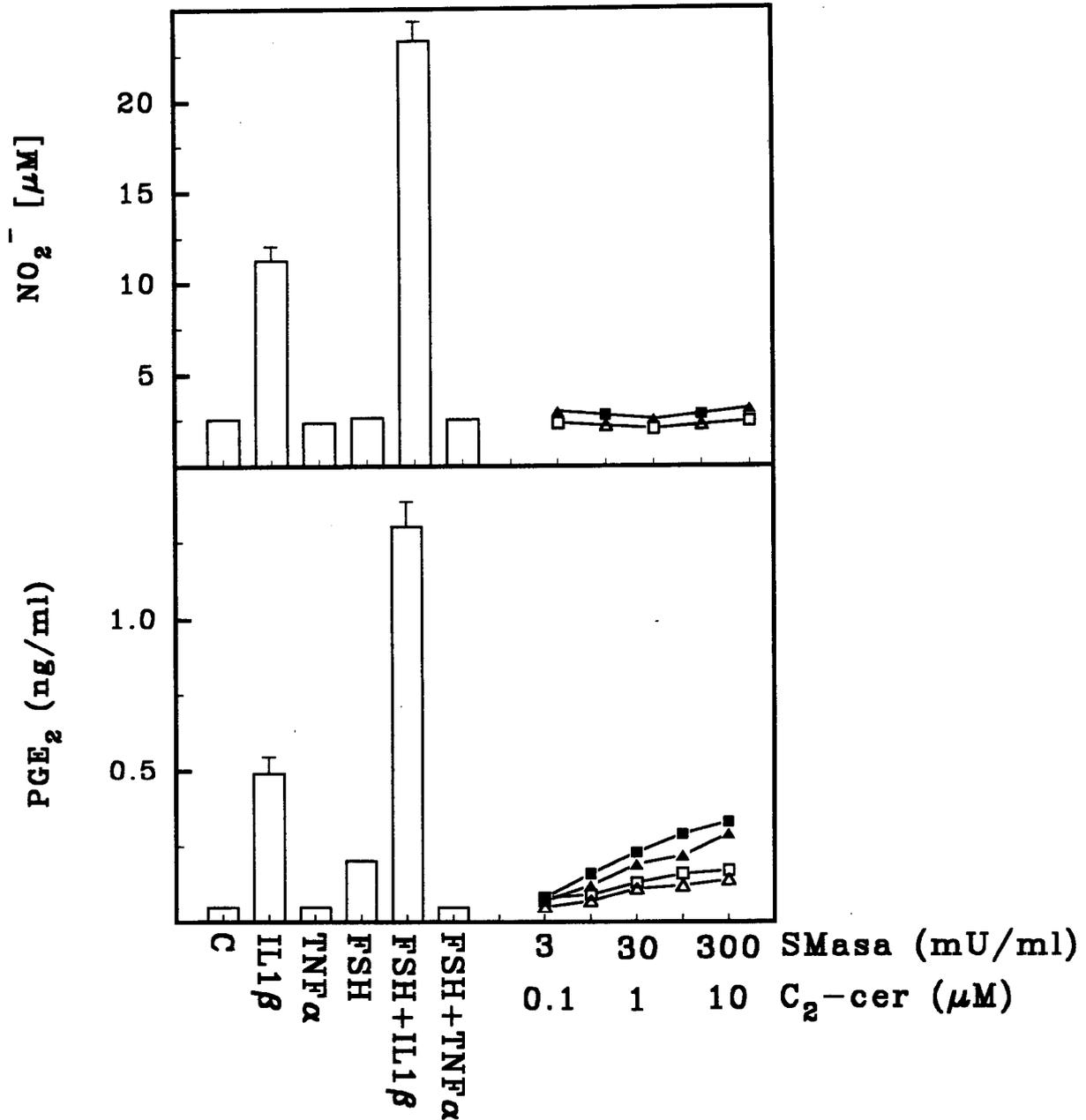
Estos experimentos son pertinentes, ya que en trabajos recientes de este laboratorio, hemos demostrado que la activación de una SMasa neutra de membrana, y la generación de ceramida, podría ser el mecanismo intracelular común implicado en los efectos inhibitorios del TNF $\alpha$  sobre la P450AROM (Santana *et al.*, 1995) y la inhibición de la expresión de P450scc y 3 $\beta$ HSD por la IL1 $\beta$  (Santana *et al.*, 1996).

En estos experimentos (**Figura 3.13**, **Figura 3.14**), se observa que la acumulación de progesterona y actividad P450AROM inducida por FSH, son inhibidas al tratar con cualquiera de estas citoquinas y, de acuerdo a resultados previos de este laboratorio (Santana *et al.*, 1995 y 1996), este efecto se reproduce al tratar con SMasa exógena para inducir hidrólisis de esfingomielina de membrana (Kolesnick, 1992; Hannun & Linardic, 1993) o el análogo permeable del segundo mensajero C6-ceramida (Hannun, 1993). De nuevo y como se observó en resultados iniciales descritos en esta memoria (**Figura 3.5**) el tratamiento con TNF $\alpha$ , sólo o en combinación con FSH no afectó ni a la acumulación de nitritos en el medio (**Figura 3.14**), ni a la actividad de NOS medida en términos de acumulación de [ $^3$ H]citrulina (a efectos de claridad no se muestran estos últimos resultados).

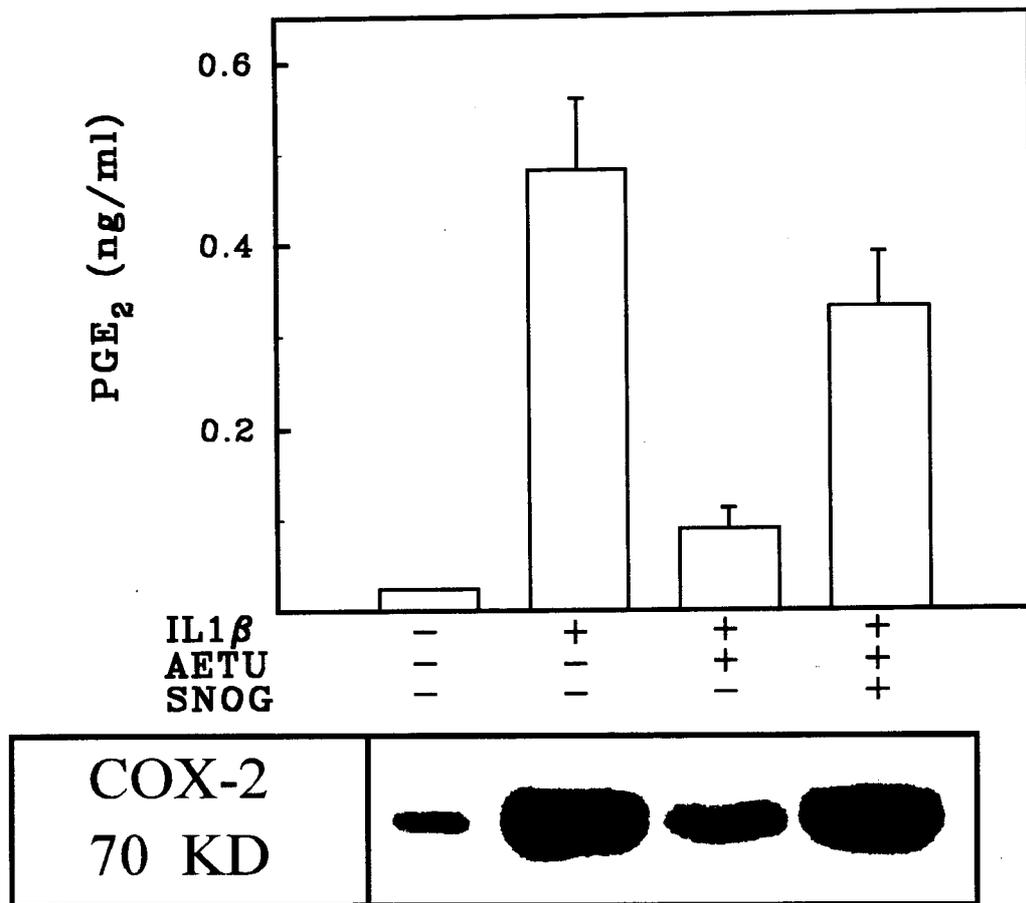
En su conjunto los resultados anteriores permiten establecer que la ceramida generada en respuesta a IL1 $\beta$  o TNF $\alpha$  es necesaria y suficiente para inducir los bien conocidos efectos inhibitorios de ambas citoquinas sobre la respuesta esteroideogénica en célula granulosa ovárica (Adashi, 1989 y 1990; Adashi & Richard, 1991). Sin embargo, de los mismos experimentos se infiere que la activación de la hidrólisis de SM juega un papel en la biosíntesis de PGE $_2$  previamente descrito por este laboratorio (Santana *et al.*, 1995 y 1996), pero que en sí mismo no es suficiente para inducir plenamente la síntesis de prostaglandinas en estas células (Santana *et al.*, 1996), fenómeno que también ha sido descrito en fibroblastos humanos tratados con ceramidas permeables e IL1 $\beta$  (Ballou *et al.*, 1992).



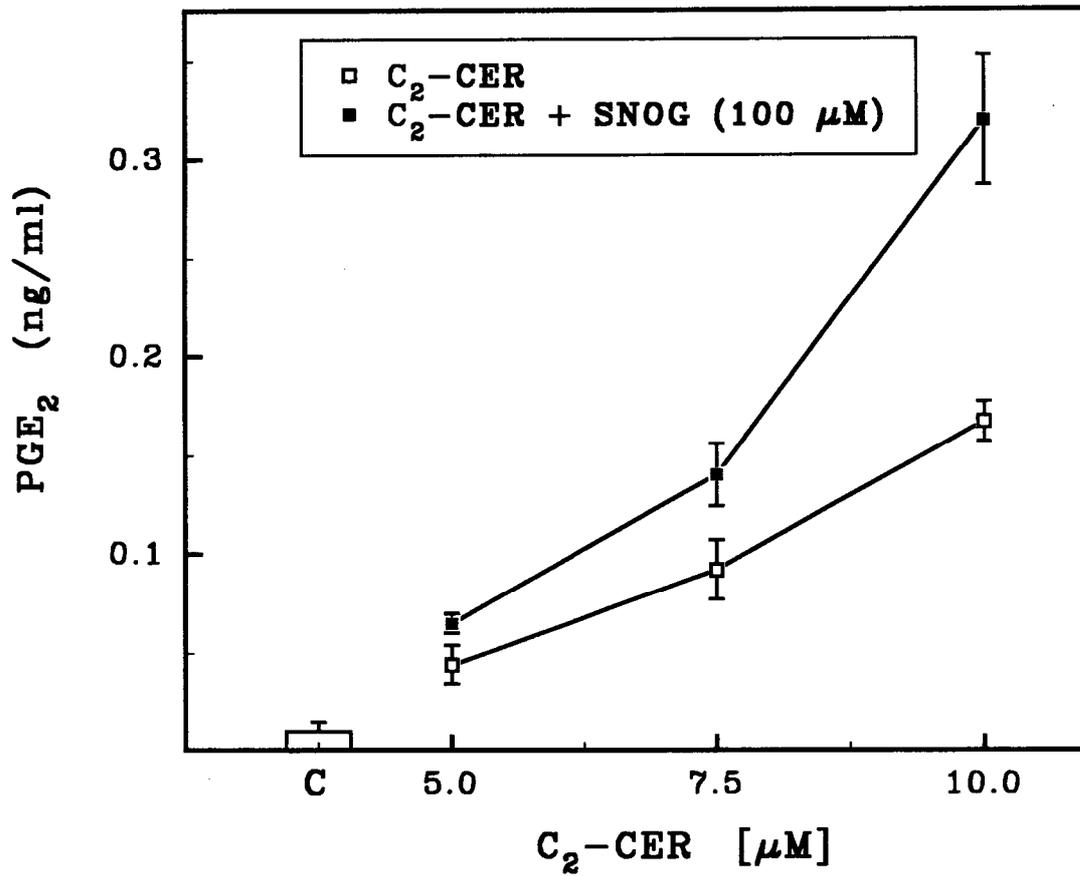
**Figura 3.13.** La generación de ceramida reproduce los efectos inhibitorios que induce la IL1 $\beta$  sobre la esteroidogénesis estimulada por FSH en célula granulosa ovárica. Las células ( $\sim 10^6$  células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante 48 h con FSH (200 ng/ml) sola o en presencia de IL1 $\beta$  (30 ng/ml), TNF $\alpha$  (30 ng/ml), y concentraciones crecientes de SMasa bacteriana (3-300 mU/ml) o ceramida permeable (0.1-10  $\mu$ M). Al final del experimento los medios se congelaron para la determinación de progesterona por RIA (panel superior) y la actividad P450AROM por el método radioenzimático descrito (panel inferior). Resultados similares se obtuvieron en otros dos experimentos.



**Figura 3.14.** La generación de ceramida no reproduce los efectos de la IL1 $\beta$  sobre la biosíntesis de NO y prostaglandinas en célula granulosa ovárica. Las células ( $\sim 10^6$  células y cuatro pocillos/tratamiento) se trataron durante 48 h con FSH (200 ng/ml) sola o en presencia de IL1 $\beta$  (30 ng/ml), TNF $\alpha$  (30 ng/ml), y concentraciones crecientes de SMase bacteriana (3-300 mU/ml) o ceramida permeable (0.1-10  $\mu\text{M}$ ). Al final del experimento los medios se congelaron para la determinación de nitritos (panel superior) y prostaglandina E<sub>2</sub> por RIA (panel superior). Resultados similares se obtuvieron en otros dos experimentos.



**Figura 3.15. Los inhibidores de la NOS bloquean la biosíntesis de PGE<sub>2</sub> y los niveles de COX-2 inmunoreactiva en células tratadas con IL1 $\beta$ .** Las células ( $\sim 5 \times 10^5$  células) se trataron durante 48 h en presencia de 30 ng/ml de IL1 $\beta$  sola o con el inhibidor de iNOS (AETU) y el donante de NO (SNOG). Las prostaglandinas se midieron por RIA y los resultados (media  $\pm$  SEM) se representan en el panel superior. En experimentos paralelos, las proteínas se separaron por electroforesis en SDS, se transfirieron a membranas de nylon y detectaron usando el anticuerpo específico y por el método quimioluminiscente descrito en Material y Métodos.



**Figura 3.16.** *El NO aumenta los efectos de la ceramida sobre la biosíntesis de PGE<sub>2</sub> en célula granulosa ovárica.* Las células ( $\sim 5 \times 10^5$  células) se trataron durante 48 h en presencia de 30 ng/ml de IL1 $\beta$  o dosis crecientes de ceramida permeable sola (○-○) o en combinación con el donante de NO (●-●). Las prostaglandinas se midieron por RIA y se muestran los resultados (media  $\pm$  SEM) de un experimento representativo de otros dos.

En células de mamífero, la biosíntesis de prostaglandinas se inicia con la liberación de ácido araquidónico por la acción de PLA<sub>2</sub> de la posición sn-2 de los fosfolípidos de membrana, que luego sirve de sustrato a dos isoformas de prostaglandina-endoperóxido G/H sintasa/ciclooxigenasa (COX-1: constitutiva; y COX-2: inducible) que lo convierte en el intermediario común (PGH<sub>2</sub>) de todos los prostanoides activos adscritos a las series de las prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina (DeWitt, 1991). La forma constitutiva COX-1, produce prostanoides activos bajo condiciones no estimuladas y es responsable de la generación basal de prostaglandinas tisulares (Baird *et al.*, 1993; DeWitt, 1993), y la inducible (COX-2) es la isoforma típica de la respuesta inflamatoria, que ha sido identificada en el ovario como el enzima responsable de la generación de PGE<sub>2</sub> (Sirois *et al.*, 1992; Sirois & Richard, 1992; Wong *et al.*, 1992) que ocurre durante el pico de LH que precede a la ovulación (Hunzicker-Dunn & Birnbaumer, 1976; Espey, 1980; Hunter & Poysler, 1985).

La forma inducible COX-2 es una hemoproteína (Shimokawa *et al.*, 1991) cuya actividad es regulable a múltiples niveles que incluyen la transcripción, traducción y autoinactivación de la proteína madura (DeWitt & Smith, 1988; Wong *et al.*, 1992; DeWitt & Meade, 1993; Morris *et al.*, 1995), y es frecuente observar una interrelación entre generación de prostaglandinas y NO (Corbett *et al.*, 1993) que incluye inhibición de la NOS en respuesta a prostaglandinas (Tetsuka *et al.*, 1994) y la inhibición de la COX-2 usando inhibidores de la NOS, efecto que es específicamente revertido usando diferentes donantes de NO (Salvemini *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1994; Franchi *et al.*, 1994).

Para verificar el papel relativo de la ceramida y el NO en la biosíntesis de prostaglandinas, se realizaron los últimos experimentos de esta memoria (**Figura 3.15** y **Figura 3.16**) donde puede observarse en primer lugar que la inhibición de la NOS con AETU reduce la biosíntesis de PGE<sub>2</sub> en células tratadas con IL1 $\beta$ , y que el efecto se revierte cuando usamos SNOG como donante de NO, reflejándose ambos efectos en los niveles de proteína inmunoreactiva presente en estas células. De la misma forma (**Figura 3.14**) el efecto dosis-dependiente de la ceramida permeable (C6-cer) sobre la acumulación de PGE<sub>2</sub> aumenta significativamente en presencia de SNOG, demostrando estos experimentos un efecto

cooperativo entre la vía de la esfingomielina y el NO no descrito hasta el momento.

## DISCUSIÓN

Además de su participación como molécula de señalización intra- e intercelular en procesos fisiológicos tan diferentes como la respuesta inflamatoria, el mantenimiento del tono vascular y la función y plasticidad neuronal (Moncada *et al.*, 1991; Nathan, 1992; Bredt & Snyder, 1994), el óxido nítrico es un mediador de otras respuestas biológicas que incluyen efectos reguladores sobre el sistema endocrino (Costa *et al.*, 1996) y la modulación de la función reproductora de los mamíferos (Kato, 1992; Schmidt *et al.*, 1992; Rettori *et al.*, 1993; Duvilamsky *et al.*, 1995; Burnett *et al.*, 1995).

La participación del NO en la regulación de la función gonadal deriva no sólo de su papel como neurotransmisor implicado a nivel hipotálamo-hipofisario en la secreción de LH y FSH (Rettori *et al.*, 1993; Ceccateli *et al.*, 1993), sino también por la capacidad del radical libre para modular de forma directa la actividad de diferentes enzimas de la esteroidogénesis (Adams *et al.*, 1992, 1993 y 1994; Van Hooris *et al.*, 1994; Burnett *et al.*, 1995; Del Punta *et al.*, 1996) y diversos procesos relacionados con repuestas fisiológicas en la gónada femenina (Elfman *et al.*, 1993; Schukowski & Tsafiri, 1994; Van Hooris *et al.*, 1994; Ben-Schlomo *et al.*, 1994a y 1994b; Chun *et al.*, 1995).

Muchas de las acciones del NO sobre la esteroidogénesis en células testiculares de Leydig se han asociado a la capacidad del radical libre para interactuar con el grupo  $Fe^{2+}$ -hemo de los enzimas esteroidogénicos (Adams *et al.*, 1992, 1993 y 1994; Burnett *et al.*, 1995; Del Punta *et al.*, 1996), y un mecanismo análogo se ha propuesto para explicar los efectos inhibitorios del radical libre sobre la P450AROM de célula granulosa humana (Van Hooris *et al.*, 1994). No obstante las dos acciones más relevantes del autacoide NO como molécula reguladora intraovárica se refieren a su participación en el proceso inflamatorio característico de la ruptura del folículo ovárico (Elfman *et al.*, 1993; Schukowski & Tsafiri, 1994) y a su capacidad para prevenir la apoptosis de las células granulosa del folículo que caracterizan al proceso de atresia folicular (Chun *et al.*, 1995).

Aunque planteado solo en fecha relativamente reciente (Elfman *et al.*, 1993), los efectos directos del NO sobre la fisiología ovárica no parecen sorprendentes si se tiene en

cuenta que diferentes productos de secreción de los macrófagos residentes del ovario, que son al mismo tiempo reguladores de la biosíntesis de NO (Moncada *et al.*, 1991; Nathan, 1992; Griffith & Stuehr, 1995) y que incluyen a la IL1 $\beta$  (Gottshall *et al.*, 1988a y 1988b; Gottshall *et al.*, 1989; Kasson & Gorospe, 1989; Fukuoka *et al.*, 1989; Kokia *et al.*, 1992; Hurwitz *et al.*, 1992; Santana *et al.*, 1996), el TNF $\alpha$  (Emoto & Baird, 1988; Roby & Terranova, 1988 y 1990; Darbon *et al.*, 1989; Adashi *et al.*, 1991; Andreani *et al.*, 1989; Santana *et al.*, 1995) e IFN $\gamma$  (Gorospe *et al.*, 1988), juegan un papel modulador importante sobre el proceso de diferenciación de la CGO (Adashi, 1989 y 1990; Adashi & Rohan, 1991; Leung & Steele, 1992; Hsueh *et al.*, 1994; Richards, 1994)

Tal y como se enunció en el apartado introductorio, en la presente memoria hemos tratado de profundizar sobre los mecanismos subyacentes a la generación de NO en el ovario, tratando no sólo de definir un sistema regulador de la síntesis de NO, sino también de aclarar en términos bioquímicos y moleculares algunos aspectos novedosos que relacionan el sistema de generación de NO con otros procesos típicos de la CGO.

**4.1 Identificación de un sistema de generación de NO localizado en la célula granulosa ovárica: papel de la IL1 $\beta$  y la FSH en el proceso:** Además de su posible función mediadora en los procesos de ruptura del folículo ovárico (Elfman *et al.*, 1993; Schukowski & Tsafiri, 1994) asociado al proceso ovulatorio (Espey, 1980) y la inhibición de la atresia folicular (Chun *et al.*, 1995), aclarar el papel modulador del NO en la gónada femenina, implica identificar/localizar un sistema fisiológicamente relevante para la generación intraovárica del radical libre (Elfman *et al.*, 1993; Ben-Schlomo *et al.*, 1994a y 1994b). Identificar un sistema de este tipo implica no solo establecer que mecanismos de señalización intracelular regulan a biosíntesis de NO y en qué tipo de célula ovárica se genera, sino también la importancia relativa del radical libre como entidad reguladora de otras funciones fisiológicas, entre las que cabe incluir la regulación de la inducción del fenotipo esteroideogénico (Van Hooris *et al.*, 1994) y/o la biosíntesis de prostaglandinas (Ben-Schlomo *et al.*, 1994a) como posibles marcadores de la diferenciación celular y ruptura del folículo ovárico (Espey, 1990; Richards, 1994).

Consecuente con su papel fundamental en los procesos de iniciación, selección, atresia y maduración folicular los primeros experimentos de este trabajo se diseñaron para intentar identificar a la célula granulosa ovárica (CGO) como la posible fuente de NO (Hsueh *et al.*, 1994; Richards, 1994). Usando como modelo a estas células mantenidas en cultivo primario (Fanjul *et al.*, 1983; Santana *et al.*, 1995 y 1996) en los estudios iniciales de esta memoria hemos aportado pruebas consistentes que definen un mecanismo generador de NO localizado al menos en parte en la CGO (Tabraue *et al.*, 1997).

Estos resultados, parecen estar en contradicción con datos anteriores obtenidos usando cultivos mixtos de células tecales y CGO (Elffman *et al.*, 1993), diferentes preparaciones de células ováricas dispersas (Ben-Schlomo *et al.*, 1994a y 1994b) o folículos preovulatorios de rata mantenidas en cultivo (Chun *et al.*, 1995). Aunque en base a estos experimentos se había postulado que la interacción entre CGO y otros tipos celulares era fundamental para la generación de NO en respuesta al tratamiento con IL1 $\beta$ , los datos presentados en esta memoria (Resumido inicialmente en las **Figuras 3.1-3.4**) demuestran claramente tal y como discutiremos a continuación, que existe un mecanismo de cooperación endocrino/paracrino entre FSH e IL1 $\beta$  implicado en la inducción y mantenimiento de la actividad de iNOS en estas células.

No obstante, las razones entre la divergencia de los resultados presentados en esta memoria (Tabraue *et al.*, 1997) y los obtenidos en otros laboratorios (Elffman *et al.*, 1993; Ben-Schlomo *et al.*, 1994a y 1994b) no son claras, y merecen ser consideradas. En primer lugar, es interesante tener en cuenta que dentro del folículo ovárico existen subpoblaciones de CGO con diferente grado de maduración (Hsueh *et al.*, 1994; Richards, 1994) que pueden perderse durante la separación por gradientes de percoll de otras células ováricas contaminantes (células de la teca, macrófagos residentes) tal y como ha sido demostrado (Kasson *et al.*, 1985). Alternativamente y de forma no excluyente, las diferencias podrían atribuirse a las dosis de IL1 $\beta$  utilizadas y/o a la preparación de citoquina empleada por otros laboratorios (Elffmann *et al.*, 1993; Ben-Schlomo *et al.*, 1994a y 1994b). En cualquier caso, el uso de diferentes métodos de separación, purificación y cocultivo de CGO y células tecales

podría explicar porque en uno de estos estudios se postula que el NO podría mediar los efectos citotóxicos de la IL-1 $\beta$  (Elfmann *et al.*, 1993), mientras que en los otros experimentos no se observa tal efecto (Ben-Schlomo *et al.*, 1994a y 1994b) o incluso llega el NO a ser un agente causal de supervivencia en el modelo más fisiológico de cultivo de folículos intactos (Chun *et al.*, 1995).

Sin embargo, y en otro orden de cosas, la posibilidad de que el efecto observado sea un epifenómeno debido a la contaminación con células de los endotelios capilares o macrófagos residentes en el ovario también puede descartarse ya que *i)* los monocitos/macrófagos tisulares no producen NOS al ser estimulados con IL1 $\beta$  (Moncada *et al.*, 1991; Nathan, 1992; Morris & Billiar, 1994); *ii)* la generación de NO por estas células se produce a una dosis mínima efectiva de la citoquina (1 ng/ml), totalmente compatible con los niveles intraváricos de la citoquina en diferentes especies (Espey, 1980; Hurwitz *et al.*, 1992; Hsueh *et al.*, 1994); *iii)* el efecto de la citoquina es específicamente antagonizado por la proteína antagonista del receptor de IL1 $\beta$  (Dinarello & Thomson, 1991); *iv)* ni los monocitos/macrófagos, ni las células endoteliales, ni las células productoras de andrógenos situadas en la teca tienen receptores a la gonadotropina FSH, que en nuestro modelo es capaz de aumentar la acumulación de nitritos inducida por IL1 $\beta$ ; *v)* los efectos amplificadores de la FSH sobre el sistema iNOS están específicamente mediados por la vía cAMP-PKA (Leung & Steele, 1992; Richards, 1994), ya que el tratamiento con el análogo but<sub>2</sub>cAMP no tuvo efecto alguno sobre la actividad NOS pero aumentó la actividad NOS de forma similar a lo observado previamente para la gonadotropina; y por último, *vi)* independientemente de la existencia en CGO de receptores relevantes al LPS (Sancho-Tello *et al.*, 1994), TNF $\alpha$  (Emoto & Baird, 1988; Roby & Terranova, 1988 y 1990) e IFN $\gamma$  (Gorospe *et al.*, 1988) en el modelo experimental utilizado en este trabajo ninguno de estos agentes aumentó la actividad NOS, aun siendo bien conocida su capacidad para inducir la generación de NO en una gran variedad de células inmuno- y no inmunocompetentes (Nüssler *et al.*, 1992; Junquera *et al.*, 1992; Scott-Burden *et al.*, 1994).

Tal y como discutiremos a continuación, el efecto potenciador de la FSH-cAMP sobre

la generación de NO inducido por IL1 $\beta$  en CGO es, sin ningún género de dudas, un hallazgo importante del presente trabajo, que nos permitió además investigar un aspecto hasta ahora no descrito sobre el papel de las biopterinas en la regulación de la función diferenciada de la CGO que aporta nuevos datos sobre la relevancia fisiológica del NO en el ovario.

En primer lugar se demuestra en este trabajo que el ligero aumento inducido por la gonadotropina sobre el mRNA de iNOS observado de forma consistente cuando las CGO son tratadas con IL1 $\beta$  no refleja aumentos paralelos de proteína inmunoreactiva (**Figura 3.3**), por lo que este efecto es atribuible a una estabilización del mensajero más que a aumentos en la transcripción y/o eficacia de la posterior traslación del mRNA de iNOS a proteína. Los resultados representados en la presente memoria definen, sin embargo, un mecanismo probable y común a otros tipos celulares (Werner-Felmeyer *et al.*, 1990), que explica los efectos potenciadores de la gonadotropina sobre la actividad enzimática de la iNOS previamente inducida por IL1 $\beta$ .

Aunque durante la oxidación del grupo guanidino terminal de la arginina no se aprecia transformación neta de la tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) a BH<sub>2</sub>, tal y como ocurre en las otras reacciones enzimáticas de hidroxilación de aminoácidos (Kaufman, 1963; Brennehan & Kafan, 1964; Loenberg *et al.*, 1967; Nichol *et al.*, 1985), una concentración intracelular adecuada de BH<sub>4</sub> generada de forma dependiente del enzima regulador GTPCH por la vía *de novo*, parece condicionar la actividad catalítica final de las formas inducibles y constitutivas del enzima (Tayeh & Marletta, 1989; Werner-Felmeyer *et al.*, 1990; Gross & Levi, 1992). Este efecto del BH<sub>4</sub> sobre la actividad iNOS ha sido demostrado en fibroblastos de ratón (Werner-Felmeyer *et al.*, 1990), músculo liso (Gross & Levi, 1992) y células endoteliales de diferentes especies (Gross & Levi, 1992; Werner-Felmeyer *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1992).

Aunque el mecanismo implicado en el absoluto requerimiento del coenzima para una óptima actividad de NOS ha sido controvertido, evidencias experimentales obtenidas con preparaciones purificadas de las isoformas neuronal e inducible del enzima (Sthuer *et al.*,

1991a; Baek *et al.*, 1993; Klat *et al.*, 1995) o mutagénesis dirigida en experimentos de transfección de la isoforma endotelial del enzima (Lee *et al.*, 1995) demuestran que el BH<sub>4</sub> es fundamental para mantener en forma de dímeros a todas las especies moleculares de NOS (inducibles y constitutivas), y que esta conformación cuaternaria es imprescindible para mantener el sitio activo del enzima en un estado de máximo rendimiento (Stuher, 1997).

En la memoria que se presenta, hemos demostrado en CGO la importancia de la concentración intracelular de BH<sub>4</sub> para una óptima actividad de iNOS usando diferentes aproximaciones experimentales que incluyen *i*) la demostración por RT-PCR que el efecto independiente de FSH e II1 $\beta$  sobre la transcripción de GTPCH, y la potencianción más que aditiva observada sobre los niveles de su mRNA en células tratadas con ambos agentes, se correlacionan con los niveles de actividad enzimática iNOS en CGO; *ii*) usando diferentes agentes farmacológicos (DAHP, SEP, MTX) también demostramos que la inhibición de la vía *de novo* con DAHP, o la activación de la de salvamento con SEP (Nichol *et al.*, 1983), modulan la actividad NOS en estas células; y por último, *iii*) al determinar por HPLC los niveles intracelulares de BH<sub>4</sub> y otros metabolitos de la ruta, y tal y como discutiremos más adelante, demostramos que los diferentes tratamientos con FSH y/o los agentes usados para modular la biosíntesis por las vías *de novo* y salvamento se correlacionan con los niveles de expresión de la GTPCH.

Aunque entre los agentes que potencian la inducción de GTPCH como mecanismo de amplificación de la actividad enzimática de iNOS, se encuentran los activadores de la vía cAMP-PKA (Hattori & Gross, 1993; Scott-Burden *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1994), en esta memoria se demuestra por primera vez que este efecto puede depender de un receptor hormonal acoplado a la generación de cAMP bajo condiciones fisiológicas. Previamente sólo en un caso, usando células tumorales de glándula adrenal (clón Y-1 y su mutante Kin-8 que sobreexpresa PKA tipo I) se había demostrado que la estimulación con análogos permeables del cAMP o el tratamiento con dosis suprafisiológicas de ACTH eran capaces de aumentar moderadamente los niveles intracelulares de BH<sub>4</sub>, aunque este efecto no se pudo reproducir en células adrenales normales mantenidas en cultivo primario (Duch

*et al.*, 1986).

Tomados en su conjunto, los resultados presentados en esta primera parte son importantes por sí mismos y nos permiten postular no sólo la existencia de un sistema de generación de NO en el ovario que queda circunscrito, al menos en parte, a la célula granulosa ovárica, sino también que este sistema, que puede estar implicado en los procesos de prevención de la atresia folicular (Chun *et al.*, 1995) y ovulación (Elfman *et al.*, 1993; Schukowski & Tsafiri, 1994), es regulable por FSH e IL1 $\beta$  (Tabraue *et al.*, 1997).

Puesto que en el proceso de crecimiento y desarrollo folicular participan además de las gonadotropinas (FSH y LH) otros factores intraováricos que proporcionan a través de diferentes vías de señalización un ajuste más fino de los efectos de las hormonas hipofisarias (Adashi, 1989 y 1990; Leung & Steele, 1992; Richards, 1994), los resultados de este trabajo apoyan la existencia de mecanismos adicionales de regulación de la vía arginina/NO, hecho que está siendo considerado en este laboratorio.

**4.2. Los niveles intracelulares de tetrahydrobiopterina juegan un papel importante en la regulación de la esteroidogénesis en célula granulosa ovárica:** Como la vía de señalización FSH-cAMP juega un papel determinante en la diferenciación de la CGO (Amsterdam *et al.*, 1989; Richards, 1994), nos pareció poco probable que la única función fisiológica implicada en los aumentos de BH<sub>4</sub> intracelular inducidos por la gonadotropina fuera estabilizar la forma activa de iNOS, y ello a pesar de las evidencias que apoyan el papel importante del NO como un factor intraovárico implicado en la regulación del desarrollo folicular (Chun *et al.*, 1995) y la ovulación (Elfman *et al.*, 1993; Schukowski & Tsafiri, 1994).

Esta posibilidad nos llevó no sólo a investigar si, como ocurre en otros tejidos, los aumentos transcripcionales de la GTPCH se correlacionan con la concentración intracelular de tetrahydrobiopterina (Nichol *et al.*, 1985), sino también en que forma podría estar el BH<sub>4</sub> implicado en la regulación de la función diferenciada de la CGO y más concretamente en la regulación de la respuesta esteroidogénica.

En este sentido, el tratamiento con FSH no solo aumentó la concentración intracelular de tetrahidrobiopterina en CGO, que coinciden con los aumentos del mRNA de GTPCH, sino que la inhibición de este enzima con DAHP redujo de forma dosis-dependiente los niveles de BH<sub>4</sub> acumulados por la vía *de novo* y, de forma sorprendente, este efecto se correlacionó con una reducción en la acumulación de progesterona y actividad de la P450AROM en células tratadas con FSH. El fenómeno observado es específico de la CGO, ya que en células tumorales de Leydig MA-10 que se caracterizan por una respuesta esteroideogénica rápida (Ascoli, 1981a y 1981b) el tratamiento con SEP o en combinación con LH, no modificó los niveles de progesterona acumulada en el medio de cultivo.

El descenso paralelo observado entre niveles intracelulares de BH<sub>4</sub> y actividad esteroideogénica observado en células tratadas con DAHP y FSH, pudo revertirse de forma específica usando SEP como sustrato de la vía de salvamento, por lo que no puede atribuirse demostrándose así que el efecto no se debe a un posible efecto tóxico inespecífico del compuesto (Baier-Bitterlich *et al.*, 1995; Schobersberger *et al.*, 1996). La relevancia fisiológica de este hecho se confirmó en experimentos adicionales donde se demostró que el tratamiento con SEP aumentó la biosíntesis de progesterona hasta niveles próximos al 50% de la respuesta inducida por la FSH. Pero además pudo observarse que si bien en presencia de FSH-cAMP al bloquear la síntesis de BH<sub>4</sub> disminuye también, y de forma específica, la señal de amplificación de los enzimas P450SCC (McMasters *et al.*, 1987; Simpson *et al.*, 1992) y 3 $\beta$ HSD (Martel *et al.*, 1990) implicados en la biosíntesis de progesterona y de la P450AROM encargada de la aromatización de los andrógenos C19 en estrógenos (Miller, 1988; More & Miller, 1991), la SEP por sí misma solo afectó a la transcripción de los enzimas implicados en la biosíntesis de progesterona.

Estos hechos sugieren un efecto diferenciado del BH<sub>4</sub> sobre los enzimas esteroideogénicos que en principio podemos definir como facilitadores para el caso de la P450AROM y coactivadores para P450SCC y 3 $\beta$ HSD. Aunque estos datos son por sí mismos importantes, el mecanismo por el que un aumento intracelular de BH<sub>4</sub> regula la transcripción de genes específicos de la esteroideogénesis en CGO no es, por el momento, fácilmente

explicable.

De hecho en los estudios ya mencionados usando células tumorales adrenales Y-1 y el mutante Kin-8, no pudo demostrarse una correlación entre generación de esteroides después de la estimulación con ACTH-cAMP y acumulación celular de BH<sub>4</sub> (Duch *et al.* 1986). No obstante y aparte de su función como coenzima redox en las reacciones de hidroxilación que limitan la biosíntesis de neurotransmisores derivados de aminoácidos (Kaufman, 1963; Brenneman & Kafan, 1964; Tietz *et al.*, 1965; Loenberg *et al.*, 1967; Shiman *et al.*, 1971; Nichol *et al.*, 1985), un número creciente de evidencias sugieren un papel más versátil para el BH<sub>4</sub> en diferentes sistemas biológicos (Werner *et al.*, 1993).

En este sentido se ha implicado a este cofactor y a otros intermediarios pterínicos de la vía en respuestas celulares diversas que incluyen *i*) estimular la liberación neuronal de los neurotransmisores dopamina (Koshimura *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1994), serotonina (Mataga *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1991), acetilcolina (Ohue *et al.*, 1991) y glutamato (Mataga *et al.*, 1991); *ii*) promover la proliferación de células hematopoyéticas normales (Ziegler *et al.*, 1982 y 1986; Tanaka *et al.*, 1989) y transformadas (Kerler *et al.*, 1990), timocitos (Ziegler *et al.*, 1986; Schott *et al.*, 1992) y células cromafines PC12 de rata (Anastasiades *et al.*, 1996); y finalmente, *iii*) la inducción de apoptosis en la línea monocítica humana U937 (Baier-Bitterlich *et al.*, 1995) y células epiteliales alveolares de rata L2 (Schobersberger *et al.*, 1996). Añadido a estos efectos biológicos importantes, se ha postulado también que los derivados más estables de la vía (neopterina) aparecen elevados en sangre durante ciertos tipos de sepsis, infección por HIV y cáncer (Fuchs *et al.*, 1993; Strohmaier *et al.*, 1987), y se ha sugerido que este efecto es debido a un posible papel regulador del tono oxidativo (red-ox) intracelular (Baier-Bitterlich *et al.*, 1997).

Aunque los datos anteriores apoyan un papel importante para los compuestos pterínicos en la regulación de diferentes procesos celulares, queda aún por aclarar por qué mecanismo asociado a los aumentos intracelulares de BH<sub>4</sub> la FSH induce la transcripción de enzimas de la esteroidogénesis, aun cuando algunas posibilidades que están siendo

actualmente consideradas de forma experimental en este laboratorio, merecen ser discutidas.

Aunque la activación de la vía FSH-cAMP mediada por la serina/treonina Quinasa PKA juega un papel importante en la diferenciación de la CGO y en la adquisición por la misma del fenotipo esteroideogénico, el cómo este mecanismo de transducción de señales induce la expresión génica en estas células ha empezado a aclararse sólo después de la caracterización molecular de los genes que codifican los enzimas de esta vía (Miller, 1988).

Como en otros tipos celulares (Sassone-Corsi 1995; Calkhoven & Geert, 1996), la activación por cAMP de las subunidades catalíticas de la PKA (tipo II) presente en célula granulosa (Richards, 1994), actúa por un mecanismo que implica su traslocación nuclear y la fosforilación de CREB, proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (Mukherjee *et al.*, 1996). El CREB es un miembro de la familia multigénica bZIP de factores activadores de la transcripción (ATFs) cuyos miembros se caracterizan por tener en su estructura una región básica (50% Lys/Arg) de unión a secuencias palindrómicas (TGACGTCA) de reconocimiento en el DNA (Sassone-Corsi, 1995) y una  $\alpha$ -helice que forma cremallera (Zip) de leucinas (Borrelli *et al.*, 1992) que le confiere a la proteína la capacidad para la formación de super-complejos de factores de transcripción (Calkhoven & Geert, 1996).

Una vez fosforilado en diferentes serinas específicas en torno a la Ser<sup>133</sup> que forman el denominado dominio inducible por quinasas (Meyer & Habener, 1993), los homodímeros de CREB, o sus heterodímeros con otros factores de transcripción, se unen a los correspondientes elementos nucleares CRE (Hoefler *et al.*, 1988; Gonzalez *et al.*, 1989; Borrelli *et al.*, 1992; Sassone-Corsi 1995; Calkhoven & Geert, 1996) presentes de forma ubicua en la región promotora de numerosos genes de eucariotas (Richards *et al.*, 1995; Sassone-Corsi 1995; Calkhoven & Geert, 1996). Los dímeros de CREB fosforilado en Ser<sup>133</sup> pueden iniciar la transcripción de genes específicos de respuesta a cAMP (Alberts *et al.*, 1994), efecto que es incrementado por la fosforilación de otra Ser<sup>129</sup> y atenuado por la fosforilación en Ser<sup>142</sup> o simplemente por desfosforilación del factor de transcripción (Vallejo *et al.*, 1996).

Sin embargo, deben ser tenidos en cuenta varias cuestiones para entender el mecanismo de regulación de la transcripción de los enzimas de la esteroidogénesis por la vía cAMP-PKA (Watermann, 1994), y por tanto para realizar hipótesis consistentes que expliquen los efectos del BH<sub>4</sub> sobre este parámetro. En primer lugar, después de la caracterización molecular de CREB (Hoeffler *et al.*, 1988) se han caracterizado al menos diez productos de "maduración alternativa" adicionales de una familia de proteínas (CRE-proteínas) con capacidad de unirse a CRE y que pueden actuar como activadores o inhibidores de la transcripción (Sassone-Corsi *et al.*, 1995).

Entre los primeros se encuentran los activadores CREB, CREM $\tau$  y ATF1 (Gonzalez & Montminy, 1989; Rehfuss *et al.*, 1991; Foulkes *et al.*, 1992) mientras que en el grupo de los represores se incluyen CREM $\alpha$ , CREM $\beta$ , CREM $\gamma$ , E4BP4 y CREB-2 (Laoide *et al.*, 1993, Cowell *et al.*, 1992; Karpinski *et al.*, 1992) y el elemento rápidamente inducible, e inhibitorio, ICER (represor inducible del CRE) generado a partir de un promotor alternativo de CREM (Molina *et al.*, 1993; Stehle *et al.*, 1993) y que antagoniza la transcripción mediada por cAMP (Sasone-Corsi, 1995).

Mientras la activación de la vía cAMP-PKA induce la fosforilación de CREB y CREM $\tau$  que se convierten en poderosos inductores de la transcripción (Foulkes *et al.*, 1991) uno de los primeros efectos de este proceso es la inducción de CREM pero también del principal modulador negativo de la respuesta a cAMP que es ICER (Laoide *et al.*, 1993).

En base a los datos anteriores, podría postularse que el efecto del BH<sub>4</sub> sobre la regulación de la esteroidogénesis podría ejercerse a diferentes niveles que pueden incluir bien la inducción de la fosforilación de CREB (Meyer & Habener, 1993; Alberts *et al.*, 1994) y/o la inhibición de su desfosforilación por una fosfatasa nuclear tipo PP2A encargada de desfosforilar el factor de transcripción (Wadzinski *et al.*, 1993). Aunque sugestiva, esta posibilidad solo puede aceptarse si se demuestra un aumento en la fosforilación de CREB al aumentar los niveles intracelulares de BH<sub>4</sub> con sepiapterina. Aunque se están realizando los experimentos correspondientes, es poco probable la participación de un mecanismo de este

tipo, que no explicaría los efectos diferentes sobre la transcripción observados para los enzimas regulables de la biosíntesis de progesterona (P450<sub>SCC</sub> y 3 $\beta$ HSD) y la biosíntesis de estrógenos (P450<sub>AROM</sub>).

Alternativamente y de forma análoga a como participa en la activación de iNOS, podría postularse que el BH<sub>4</sub> pudiera jugar un papel importante en la homo/heterodimerización de CREB para activar la transcripción, aunque no hay ninguna evidencia experimental para un mecanismo de regulación de este tipo, será objeto de atención especial en un próximo futuro.

**4.3. Relación entre ceramida y NO en la regulación de la biosíntesis de prostaglandinas en célula granulosa ovárica: Efectos divergentes del TNF $\alpha$  y la IL1 $\beta$ :** El TNF $\alpha$  y la IL1 $\beta$  son dos citoquinas inmunológicamente diferentes aunque de idéntico PM (17 Kda) producidas por monocitos/macrófagos y otras células inmunocompetentes (Dinarello, 1988 y 1989; Vilceck & Lee, 1991). Aunque básicamente asociada su acción a la regulación de los mecanismos de la respuesta inmune, los efectos generales de ambas citoquinas exceden con mucho a sus efectos moduladores sobre células inmunocompetentes y su participación en la regulación de una gran variedad de respuestas biológicas en células normales y transformadas es ampliamente aceptada (Beutler & Cerami, 1988; Dinarello, 1988 y 1989; Dinarello & Thomson, 1991; Vilceck & Lee, 1991).

Aunque ambas citoquinas inducen numerosas respuestas celulares comunes, hecho que se ha relacionado con su capacidad de desencadenar idénticos mecanismos de señalización intracelular entre los que se han identificado la activación de proteínas G (O'Neill *et al.*, 1990; Yanaga *et al.*, 1992) la generación de diacilglicerol y activación de PKC y la fosforilación de idénticas proteínas intracelulares (Rossoff *et al.*, 1988; Schütze *et al.*, 1992), la forma precisa en que ambas citoquinas transmiten la señal al interior celular son poco conocidos.

En este sentido, la reciente caracterización molecular de dos tipos de receptores

monoméricos diferentes para la IL1 $\beta$  (Calotta *et al.*, 1993; Sims *et al.*, 1993) y para el TNF $\alpha$  (Loetscher *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990) no ha permitido ningún avance significativo a la hora de establecer un sistema de segundos mensajeros responsable de las variadas y numerosas respuestas celulares desencadenadas por estos ligandos reguladores (Dinarello, 1988; Dinarello & Thomson, 1991; Vilceck & Lee, 1991; Tartaglia & Goeddel, 1992; Heller & Krönke, 1994), ya que ninguno de estos receptores guarda homología de secuencia con otras familias de receptores conocidas, que incluyen los acoplados a proteínas G, o las proteínas de reconocimiento con actividad intrínseca de tirosina- o serina/treonina quinasa.

Los receptores a IL1 $\beta$ , de tipo I (pp80ILR) y tipo II (pp60ILR) se diferencian entre sí en que el de bajo PM es capaz de unir al ligando pero al carecer de dominio intracelular, no participa en la transmisión de señales por lo que ha sido designado como receptor de camuflaje o receptor *decoy* (Calotta *et al.*, 1993; Sims *et al.*, 1993). En cambio los dos tipos diferentes de receptores monoméricos para el TNF $\alpha$  (pp55TNFR; pp70TNFR) muestran además de diferencias significativas en su distribución celular y estructura primaria (Loetscher *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990), que ambos están acoplados a sistemas de señalización intracelular.

En fecha relativamente reciente, se ha demostrado que la generación de ceramida iniciada por la activación de una o más esfingomielinasas (SMasa) de distinta localización intracelular y pH óptimo se comporta como un nuevo segundo mensajero intracelular que media muchas de las respuestas celulares inducidas por diferentes agonistas que incluyen además de la VitD<sub>3</sub>, el IFN $\gamma$ , la IL1 $\beta$  y el TNF $\alpha$  (Kolesnick, 1992; Hannun & Linnardic, 1994; Hannun, 1994).

Esta nueva vía de señalización provee al menos un sistema de segundos mensajeros común a ambas citoquinas, y en este sentido datos previos de este laboratorio ya se había demostrado que la ceramida actuaba como mensajero intracelular implicado en la inhibición de la esteroidogénesis inducida por la IL1 $\beta$  y el TNF $\alpha$  en CGO estimuladas con FSH

(Santana *et al.*, 1995 y 1996). En base a estos resultados, en el presente estudio se compararon en primer lugar los efectos de ambas citoquinas sobre la producción de NO y PGE<sub>2</sub> en CGO y luego, tal y como pasaremos a discutir, la posible participación de la ceramida en el proceso.

Aunque de acuerdo a datos (Santana *et al.*, 1995 y 1996) la acumulación de progesterona y la actividad P450AROM inducida por FSH, son inhibidas al tratar con cualquiera de estas citoquinas, independientemente de la presencia de FSH el tratamiento con TNF $\alpha$  no afectó la acumulación de nitritos en el medio, ni la actividad de NOS medida en términos de acumulación de [<sup>3</sup>H]citrulina ni aumentó la acumulación de PGE<sub>2</sub> en el medio de cultivo.

Además, es importante señalar que mientras el efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis inducido por ambas citoquinas se reproduce al tratar con SMasa exógena y C6-ceramida, la activación de la vía de la esfingomielina con estos agentes no tuvo efecto apreciable sobre la actividad NOS. De forma análoga, el TNF $\alpha$  no modificó por sí mismo ni en presencia de FSH la acumulación de PGE<sub>2</sub> en el medio, aunque tanto el tratamiento con SMasa exógena como con ceramida permeable solas o en presencia de la gonadotropina indujeron un ligero aumento en la biosíntesis de prostaglandinas (Santana *et al.*, 1996).

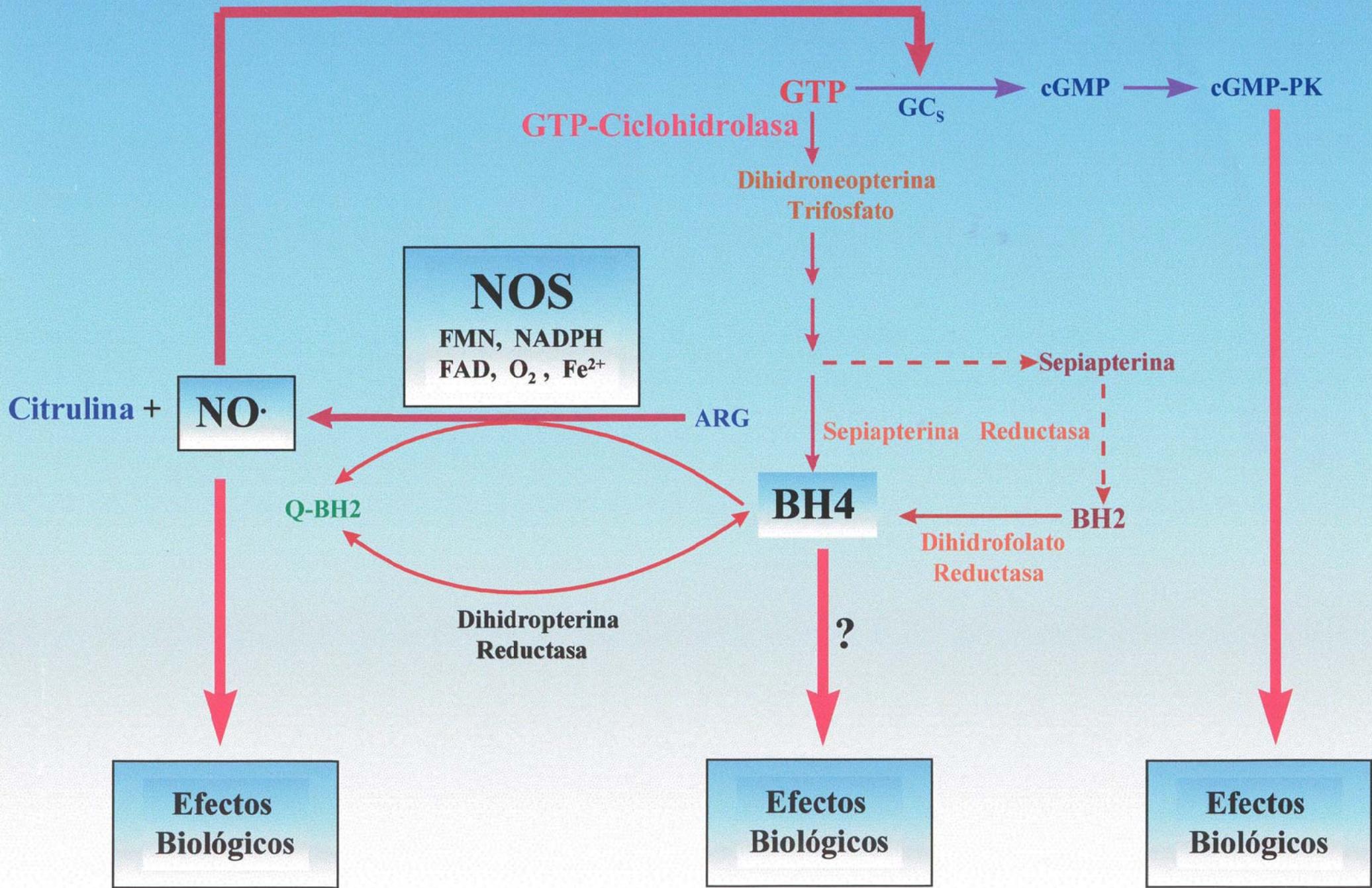
El análisis de estos datos nos permite plantear en primer lugar y de acuerdo a nuestra hipótesis anterior que la generación de ceramida en respuesta a IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  es suficiente para inhibir la respuesta esteroidogénica en células estimuladas con FSH, aunque no para reproducir del todo los efectos de la IL1 $\beta$  sobre la biosíntesis de PGE<sub>2</sub> (Santana *et al.*, 1996) o la inducción de iNOS (esta memoria). Este laboratorio ya había demostrado que los niveles de expresión del mRNA de la forma inducible de la prostaglandina-endoperoxidasa G/H sintasa/ciclooxigenasa (COX-2) aumentan en respuesta a la activación de la vía de la esfingomielina con SMasa exógena o ceramida permeables (Santana *et al.*, 1996).

Aunque estos resultados están aparentemente en contradicción con el hecho de que

sólo la IL1 $\beta$  fue capaz de aumentar de forma efectiva la acumulación de prostaglandina E<sub>2</sub> en el medio de cultivo (Santana *et al.*, 1996). Resultados similares, y hasta cierto punto coherentes con los mecanismos complejos de regulación descritos para la COX-2 (De Witt, 1991), han sido también descritos en fibroblastos humanos, en los que el tratamiento con ceramidas permeables aumentaban la expresión de COX-2 pero no reproducían los efectos de la IL1 $\beta$  sobre la biosíntesis de PGE<sub>2</sub> (Ballou *et al.*, 1992).

Como en otras líneas celulares (Salvemini *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1994; Franchi *et al.*, 1994; Tetsuka *et al.*, 1996), en esta memoria demostramos que el tratamiento con inhibidores de la NOS antagoniza los efectos de la IL1 $\beta$  sobre la acumulación de PGE<sub>2</sub> y niveles celulares de proteína inmunoreactiva, y que este efecto es específicamente revertido cuando se usa SNOG como donante de NO (**Figura 3.15**). Puesto que estos resultados sugieren un papel importante para el NO en la biosíntesis de prostaglandinas en CGO, se plantearon los experimentos resumidos en la **Figura 3.16**. En ellos queda claramente demostrado que en presencia de NO exógeno, los bajos niveles de PGE<sub>2</sub> producidos en respuesta a ceramida, aumentan hasta alcanzar los observados con IL1 $\beta$ .

En conjunto puede afirmarse que la generación de NO independiente de ceramida es importante para la biosíntesis de PGE<sub>2</sub> inducida por IL1 $\beta$  en estas células, siendo este el primer ejemplo descrito de un efecto cooperativo entre NO y ceramida. El mecanismo exacto de ambas vías que finalmente resultan en un efecto cooperativo en la producción final de prostaglandinas queda por desvelar. Sin embargo, experimentos previos usando análogos permeables del cGMP demuestran que los efectos del NO sobre la ceramida no están mediados por una activación de guanilato ciclasa (no se muestran los resultados), por lo que estos efectos pueden estar mediados por una estabilización del mRNA de COX-2 y/o un aumento en su traducción a proteína que estaría de acuerdo con los efectos del inhibidor de la NOS (**Figura 3.15**) sobre los niveles de proteína inmunoreactiva.



## CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo demostramos por primera vez la existencia de un sistema generador de NO en célula granulosa ovárica (CGO), que es además modulable por FSH e IL1 $\beta$ , e independiente de otras citoquinas (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) o el lipopolisacárido bacteriano (LPS).

El efecto potenciador de la FSH sobre el sistema generador de NO inducido por la IL1 $\beta$  en estas células, aunque acompañado de un ligero aumento en los niveles del mRNA de iNOS no se traduce en aumentos de proteína inmunoreactiva, y puede por tanto atribuirse a un aumento en la estabilidad del mensajero, más que a un efecto sobre la transcripción y/o posterior traducción del mRNA a proteína.

2. Mientras que la IL1 $\beta$  por sí misma es capaz de promover la inducción de iNOS, el efecto potenciador de la FSH se debe a la inducción de la GTPCH, el primer enzima regulador de la vía *de novo* en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Los resultados presentados en esta memoria demuestran además que los efectos de la FSH sobre la transcripción de mRNA de GTPCH se correlacionan con los niveles intracelulares de BH<sub>4</sub>.

Aunque en otras líneas celulares ya ha sido demostrado que la activación de la vía cAMP-PKA con but<sub>2</sub>cAMP o forskolin potenciaba los efectos de las citoquinas sobre la inducción de la GTPCH, esta es la primera demostración de un efecto de este tipo al activar directamente un receptor acoplado a proteínas G.

3. Utilizando diferentes manipulaciones farmacológicas que incluyen la inhibición de la GTPCH con DAHP, el uso del sustrato permeable de la vía *de salvamento* (SEP) y el inhibidor de la dihidrofolato reductasa (MTX), hemos demostrado además que la inducción por FSH de GTPCH tiene efectos fisiológicos importantes que exceden a la generación del BH<sub>4</sub> que actúe de coenzima para la iNOS.
4. En este sentido nuestros resultados demuestran, también por primera vez, que el

tratamiento con el sustrato de la vía de salvamento SEP, no sólo aumenta los niveles de BH<sub>4</sub> intracelular, sino que regula a nivel transcripcional la biosíntesis de progesterona en forma tiempo y dosis dependiente. El efecto estimulador del BH<sub>4</sub> sobre la biosíntesis de progesterona, implica además aumentos en la transcripción de los enzimas regulables por FSH (P450scc y 3βHSD), demostrándose así un efecto de esta molécula sobre la expresión génica no descrito con anterioridad.

5. Aunque el BH<sub>4</sub> regula a nivel transcripcional, y por sí misma, la biosíntesis de progesterona, sus efectos estimuladores sobre la biosíntesis de estrógenos y expresión del mRNA de P450AROM son estrictamente dependientes de la previa activación de la vía de señalización FSH-cAMP.

Estos efectos diferentes sobre la biosíntesis de progesterona y estrógenos demuestran la relevancia fisiológica del fenómeno, aunque los mecanismos moleculares subyacentes permanecen aún por aclarar.

6. Demostramos en esta memoria que la ceramida generada en respuesta a IL1β en CGO es necesaria y suficiente para reproducir los efectos inhibitorios de la citoquina sobre la esteroidogénesis estimulada por FSH en estas células y que es necesaria pero no suficiente para estimular la biosíntesis de PGE<sub>2</sub>.
7. Por último y aunque se demuestra claramente en esta memoria que la ceramida no está involucrada en la generación de NO en CGO, si presentamos claras evidencias de un efecto cooperativo entre NO y ceramida en la biosíntesis de prostaglandinas en estas células, siendo esta también la primera demostración de una cooperación entre estos sistemas de señalización intracelular.

# BIBLIOGRAFÍA

**Abu-Soud HM, Stuehr DJ.** Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:10769-10772 (1993)

**Adachi H, Iida S, Oguchi S, Ohshima H, Susuki H, Nagasaki K, Kawasaki H, Sugimura T, Esumi H.** Molecular cloning of a cDNA encoding an inducible calmodulin-dependent-nitric oxide synthase from rat liver and its expression in COS-1 cells. *Eur J Biochem* **217**: 37-43 (1993)

**Adams ML, Nock B, Truong R, Cicero TJ.** Nitric oxide control of steroidogenesis: Endocrine effects of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine and comparisons to alcohol. *Life Sci* **50**: PL35-PL40 (1992)

**Adams ML, Forman JB, Kalicki JM, Meyer ER, Sewing B, Cicero TJ.** Antagonism of alcohol-induced suppression of rat testosterone secretion by an inhibitor of nitric oxide synthase. *Alcohol Clin Exp Res* **17**: 660-664 (1993a)

**Adams ML, Meyer ER, Sewing BN, Cicero TJ.** Effects of nitric oxide-related agents on rat testicular function. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **269**: 230-236 (1994)

**Adashi EY, Resnick CE, Croft CS, Payne DW.** Tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin hormonal action in untransformed granulosa cells. *J Biol Chem* **264**: 11591-11597 (1989)

**Adashi EY.** Editorial: Cytokine-mediated regulation of ovarian function: encounters of a third kind. *Endocrinology* **124**: 2043-2045 (1989)

**Adashi EY.** The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: The emerging role of resident ovarian cells of the white blood cells series. *Endocr Rev* **11**: 454-464 (1990)

**Adashi EY, Richard RH.** Intraovarian regulation: peptidergic signaling systems. *Trends Endocrinol Metab* **3**: 243-248 (1991)

**Aisaka K, Gross SS, Griffith OW, Levi R.** N<sup>G</sup>-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent repressor in the guinea pig: Does nitric oxide regulated blood pressure in vivo?. *Biochem Biophys Res Commun* **160**: 881-886 (1989)

**Alberts AS, Arias J, Hagiwara M, Montminy MR, Feramisco JR.** Recombinant cyclic AMP response element binding protein (CREB) phosphorylated on Ser-133 is transcriptionally active upon its introduction into fibroblast nuclei. *J Biol Chem* **269**: 7623-7630 (1994)

**Amano F, Noda T.** Improved detection of nitric oxide radical (NO<sup>•</sup>) production in

an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO and griess reagent. *FEBS Lett.* **368**: 425-428 (1995)

**Amsterdam A, Rotmensch S, BenZe'ev A.** Coordinated regulation of morphological and biochemical differentiation in a steroidogenic cell: the granulosa cell model. *Trends Biochem Sci* **14**: 377-381 (1989)

**Anastasiadis PZ, States JC, Imerman BA, Louie MC, Kuhn DM, Levine RA.** Mitogenic effects of tetrahydrobiopterin in PC12 cells. *Molecular Pharmacology* **49**: 149-155 (1996)

**Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F.** Nitric oxide activates guanylate cyclase and increase guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 3203-3207 (1977)

**Asano K, Chee C, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS.** Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10089-10093 (1994)

**Ascoli M.** Characterization of several clonal lines of cultured leydig tumor cells: gonadotropin receptors an steroidogenic responses. *Endocrinology* **108**: 88-95 (1981a)

**Ascoli M.** Regulation of gonadotropin receptors and gonadotropin response in a clonal strain of leydig tumor cells by epidermal growth factor. *J Biol Chem* **256**: 179-183 (1981b)

**Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, Stuehr DJ.** Macrophage nitric oxide synthase subunits: purification, characterization, and role of prosthetic groups in regulating their association into dimeric enzyme. *J Biol Chem* **268**: 21120-21129 (1993)

**Beutler B, Cerami A.** Tumor necrosis, cachexia, shock and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem* **57**: 507-518 (1988)

**Beasley D, Schwartz JH, Brenner BM.** Interleukin 1 prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **87**: 602-608 (1991)

**Beckman JS, Koppenol WH.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* **271**: C1424-C1437 (1996)

**Ben-Shlomo I, Kokia E, Jackson MJ, Adashi EY, Payne DW.** Interleukin 1 $\beta$  stimulates nitrite production in the rat ovary: evidence for heterologous cell-cell interaction for insulin-mediated regulation of the inducible isoform of nitric oxide synthase. *Biol Reprod* **51**: 310-318 (1994)

- Ben-Shlomo I, Adashi EY, Payne DW.** The morphogenic/cytotoxic and prostaglandin-stimulating activities of interleukin-1 $\beta$  in the rat ovary are nitric oxide independent. *J Clin Invest* **94**: 1463-1469 (1994)
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW.** Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cells apoptosis. *Endocrinology* **133**: 2204-2212 (1993)
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW.** Gonadotropin releasing hormone (GnRH) directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: Biochemical and *in situ* detection of DNA fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* **134**: 245-252 (1994)
- Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC.** The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis* **127**: 1-11 (1996)
- Borrelli E, Montmayeur JP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P.** Signal transduction and gene control: the cAMP pathway. *Crit Rev Oncog* **3**: 321-338 (1992)
- Bradford MM.** A rapid a sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254 (1976)
- Bredt DS, Snyder SH.** Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9030-9039 (1989)
- Bredt DS, Snyder SH.** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 682-685 (1990)
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH.** Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**: 714-718 (1991)
- Bredt DS, Snyder SH.** Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* **63**: 175-195 (1994)
- Brenneman AR, Kaufman S.** The role of tetrahydropteridines in the enzymatic conversion of tyrosine to 3,4-dihydroxyphenylalanine. *Biochem Biophys Res Commun* **17**: 177-183 (1964)
- Brüne B, Dimmeler S, Molina Y, Vedia L, Lapetina EG.** Minireview: nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sci* **54**:61-70 (1994)
- Burnett AL, Ricker DD, Chamness SL, Maguire MP, Crone JK, Bredt DS, Snyder SH, Chang TK.** Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biol Reprod* **52**: 1-7 (1995)

**Butler AR, Fitney FW, Williams DLH.** NO, nitrosonium ions, nitroxide ions and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharm Sci* **16**: 18-22 (1995)

**Calkhoven CF, Geert AB.** Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem J* **317**: 329-342 (1996)

**Calotta F, Re F, Murio M, Bertini R, Polentazutti N, Sironi M, Giri J, Dower SK, Sims JE, Mantovani A.** Interleukin-1 type II receptor: decoy target for IL 1 $\beta$  that is regulated by IL-4. *Science* **261**: 472-475 (1993)

**Carlone DL, Richards JS.** Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. *Molecular Endocrinology* **11**: 292-304, (1997)

**Castro L, Rodriguez M, Radi R.** Aconitase is readily inactivated by peroxyxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* **269**: 29409-29415 (1994)

**Ceccatelli S, Hulting AL, Zhang X, Gustafsson L, Villar M, Hokfelt T.** Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in the regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11292-11296 (1993)

**Charles IG, Palmer RMJ, Hickery S, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S.** Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11419-11423 (1993)

**Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C.** Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* **176**: 599-604 (1992)

**Chomczynski P, Sacchi N.** Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159 (1987)

**Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJW.** Interleukin-1 $\beta$  suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric-oxide production. *Endocrinology* **136**: 3120-3127 (1995)

**Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJW.** Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* **137**: 1447-1456 (1996)

**Cooke JP, Dzau VJ.** Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* **48**: 489-509 (1997)

**Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster JR, McDaniel ML.** Nitric Oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1731-1735 (1993)

**Corbett JA, Kwon G, Turk J, Mc Daniel ML.** IL-1beta induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry* **32**: 13767-13770 (1993)

**Costa A, Poma A, Navarra P, Forsling ML, Grossman A.** Gaseous transmitters as new agents in neuroendocrine regulation. *Journal of Endocrinology* **149**: 199-207 (1996)

**Cowell IG, Skinner A, Hurst HC.** Transcriptional repression by a novel member of the bZIP of transcription factors. *Mol Cell Biol* **12**: 3070-3076 (1992)

**Culotta E, Koshland DE.** Editorial: NO news is good news. *Science* **258**: 1862-1865 (1992)

**Darbon JM, Oury F, Laredo J, Bayard F.** Tumor necrosis factor alpha inhibits follicle-stimulating hormone-induced differentiation in cultured granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 1038-1046 (1989)

**Dawson TM, Dawson VL.** Nitric oxide synthase: Role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. *Annu Rev Med* **47**: 219-227 (1996)

**Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH.** Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6368-6371 (1991)

**Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP.** Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* **137**: 5337-5343 (1996)

**Dewitt DL, Smith WL.** Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep seminal gland determined from complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1412-1416 (1988)

**DeWitt DL, el-Harith EA, Kraemer SA, Andrews MJ, Yao EF, Armstrong RL, Smith WL.** The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthase. *J Biol Chem* **265**: 5192-5198 (1990)

**DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* **1083**: 121-134 (1991)

**DeWitt DL, Meade EA.** Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of prostaglandin G/H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2

- isozymes. Arch Biochem Biophys **306**: 94-102 (1993)
- Dinnarello CA.** Biology of interlekin-1. FASEB J **2**: 108-115 (1988)
- Dinnarello CA.** Interlekin-1 and its biologically related cytokines. Avd Inmunol **44**: 153-205 (1989)
- Dinarello CA, Thompson RC.** Blocking IL-1: Interleukin-1 receptor antagonist in vivo and in vitro. Immunol Today **12**: 404-410 (1991)
- Dix TA, Benkovic SJ.** Mechanism of oxygen activation by pteridine-dependent monooxygenases. Acc Chem Res **21**: 101-107 (1988)
- Duch DS, Bowers SW, Woolf JH, Nichol CA.** Biopterin cofactor biosynthesis: GTP cyclohydrolase, neopterin and biopterin and biopterins in tissues and body fluids of mammalian species. Life Sci **35**: 1895-1901 (1984)
- Duff G.** Immune diseases. Many roles of interleukin-1. Nature **313**: 352-353 (1985)
- Dun NJ, Dun SL, Wu SY, Förstermann U.** Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. Neurosci Lett **158**: 51-54 (1993)
- Durante W, Cheng K, Sunahara RG, Schafer AI.** Ethanol potentiates interleukin 1 $\beta$ -stimulated nitric oxide synthase expression in cultured vascular smooth muscle cells. Biochem J **308**: 231-236 (1995)
- Durham CR, Zhu H, Masters BSS, Simpson ER, Mendelson CR.** Regulation of aromatase activity of rat granulosa cells: Induction of synthesis of NADPH-cytochrome P-450 reductase by FSH and dibutyryl cyclic AMP. Mol Cell Endocrinol **40**: 211-219 (1985)
- Duvilansky BH, Zambruno C, Seilicovich A, Pisera D, Lasaga M, Diaz MC, Belova N, Rettori V, McCann SM.** Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohipophysis. Proc Natl Acad Sci USA **92**: 170-174 (1995)
- Elfman C, Corbett JA, Misko TP, McDaniel M, Beckerman P.** Nitric oxide mediates interleukin 1 $\beta$  induced cellular cytotoxicity in the rat ovary: A potential role for nitric oxide in the ovulatory process. J Clin Invest **92**: 3053-3056 (1993)
- Emoto N, Baird A.** The effect of tumor necrosis factor/cachectin on follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured granulose cells. Biochem Biophys Res Commun **153**: 792-798 (1988)
- England B-G, Niswender GD, Midgley AR.** Radioimmunoassay of stradiol 17 $\beta$  without chromatography. J.Endocrinol Metb **38**: 42-47 (1974)

**Espey LL.** Ovulation as an inflammatory reaction: a hypothesis. *Biol Reprod* **22**: 73-106 (1980)

**Fanjul LF, Ruiz De Galarreta CM, Hsueh AJW.** Progestin augmentation of gonadotropin-stimulated progesterone production by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **112**: 405-407 (1983)

**Fanjul LF, Deniz A, Quintana J, Santana P, Gonzalez J, Estevez F, Ruiz de Galarreta CM.** Diacylglycerol rather than  $Ca^{2+}$  mediates GnRH inhibition of FSH-induced steroidogenesis in ovarian granulosa cells. *Biochim Biophys Res Commun* **188**: 198-202 (1993)

**Fehsel K, Jalowy A, Qi S, Burkart V, Hartmann B, Kolb H.** Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes* **42**: 496-500 (1993)

**Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ.** The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News* **71**: 16-38 (1993)

**Fitzpatrick SL, Richards JS.** Identification of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C Leydig cells. *Mol Endocrinol* **8**: 1309-1319 (1994)

**Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Ishii K, Schmidt HHHW, Heller M, Murad F.** Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol Pharmacol* **38**: 7-13 (1990)

**Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HHHW, Heller M, Murad F.** Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1788-1792 (1991)

**Förstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F.** Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* **42**: 1849-1857 (1991)

**Förstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS.** Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J* **14 (suppl.1)**: 10-15 (1993)

**Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P.** CREM gene: use of alternative DNA binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* **64**: 739-749 (1991)

- Franchi AM, Chaud M, Rettori V, Suburo A, McCann SM, Gimeno M.** Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 539-543 (1994)
- Friedman PA, Kappelman H, Kaufman S.** Partial purification and characterization of tryptophan hydroxylase from rabbit hindbrain. *J Biol Chem* **247**: 4165-4173 (1972)
- Fuchs D, Weiss G, Wachter H.** Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int Arch Allergy Immunol* **101**: 1-6 (1993)
- Fukuoka M, Mori T, Taii S, Yasuda K.** Interleukin-1 inhibits luteinization of porcine granulosa cells in culture. *Endocrinology* **122**: 884-890 (1988)
- Fukuoka M, Taii S, Yasuda K, Takakura K, Mori T.** Inhibitory effect of interleukin-1 on luteinizing hormone-stimulated 3'-5'-monophosphate accumulation by cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* **125**: 136-143 (1989)
- Fukuoka M, Yasuda K, Fujiwara H, Hanzaki H, Mori T.** Interactions between interferon gamma, tumour necrosis factor alpha, and interleukin-1 in modulating progesterone and estradiol production by human luteinized granulosa cells in culture. *Hum Reprod* **7**: 1361-1364 (1992)
- Fukushima T, Nixon JC.** Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal Biochem* **102**: 176-188 (1980)
- Fukuto JM, Chaudhuri G.** Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**: 165-194 (1995)
- Furchgott RF, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376 (1980)
- Furchgott RF.** The role of the endothelium in the response of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **24**: 175-197 (1984)
- Furfine ES, Harmon MF, Paith JE, Knowles RG, Salter M, Kiff RJ, Duffy C, Hazelwood R, Oplinger JA, Garvey EP.** Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by S-methyl-L-thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline. *J Biol Chem* **269**: 26667-26683 (1994)
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R.** Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggest role as intercellular messenger in the brain. *Nature Lond* **336**: 385-388 (1988)

**Garthwaite J, Boulton CL.** Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* **57**: 683-706 (1995)

**Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di SM, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Billiar TR.** Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3491-3495 (1993)

**Giovanelli J, Campos KL, Kaufman S.** Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7091-7095 (1991)

**Gonzalez GA, Yamamoto KK, Fischer WH, Karr D, Menzel P, Biggs III W, Vale WW, Montminy MR.** A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP responsive regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* **337**: 749-752 (1989)

**Gonzalez GA, Montminy MR.** Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at Ser 133. *Cell* **59**:675-680 (1989)

**Gorospe WC, Tichel T, Kasson BG.** Gamma-interferon inhibits rat granulosa cell differentiation in culture. *Biochem Biophys Res Commun* **157**: 891-897 (1988)

**Gottschall PE, Katsuura G, Hoffman ST, Arimura A.** Discordance in the effect of Il-1 on rat granulosa cells differentiation induced by follicle stimulating hormone or activators of adenilate cyclase. *Biol Reprod* **39**: 1074-1085 (1988)

**Gottschall PE, Katsuura G, Hoffmann ST, Arimura A.** Interleukin-1 an inhibitor of luteinizing hormone receptor formation in cultured granulosa cells. *FASEB (Fed Am Soc Exp Biol) J* **2**: 2492-2496 (1988)

**Gottschall PE, Katsuura G, Arimura A.** Interleukin-1 $\beta$  is more potent than interleukin- $\alpha$  in suppressing follicle stimulating hormone-induced differentiation of ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 764-770 (1989)

**Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum SR.** Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7764-7768 (1981)

**Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P.** Nitrate synthesis in the germ-free and conventional rat. *Science* **212**: 56-58 (1981)

**Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum S.** Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrite in biological fluids. *Anal Biochem* **126**: 131-138 (1982)

**Greenwald GS, Terranova PF.** Follicular selection and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill J (Eds) Raven Press, New York 387-445 (1988)

**Griffith OW, Stuehr DJ.** Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* **57**: 707-736 (1995)

**Gross SS, Jaffe EA, Levi R, Kilbourn RG.** Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 823-829 (1991)

**Gross SS, Levi R.** Tetrahydrobiopterin synthesis: an absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* **267**: 25722-25729 (1992)

**Hannun YA, Linardic CM.** Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids. *Biochim Biophys Acta* **1154**: 223-236 (1993)

**Hannun YA.** The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* **269**: 3125-3128 (1994)

**Hatakeyama K, Inaue Y, Harada T, Kagamiyama Y.** Cloning and sequencing of cDNA encoding rat GTP cyclohydrolase I, the first enzyme of the tetrahydrobiopterin biosynthetic pathway. *J Biol Chem* **255**: 765-769 (1991)

**Hatano O, Takayama K, Imai T, et al.** Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* **120**: 2787-2797 (1994)

**Hattori Y, Gross SS.** GTP-Cyclohydrolase I mRNA is induced by LPS in vascular smooth muscle: Characterization, sequence and relationship to nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **195**: 435-441 (1993)

**Hausladen A, Fridovich I.** Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, nitric oxide does not. *J Biol Chem* **269**: 29405-29408 (1994)

**Heckert LL, Daley IJ, Griswold MD.** Structural organization of follicle stimulating receptor gene. *Mol Endocrinol* **6**: 70-80 (1992)

**Hedin L, McKnight GS, Lifka J, Durica JM, Richards JS.** Tissue distribution and hormonal regulation of messenger ribonucleic acid for regulatory and catalytic subunits of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases during ovarian follicular development luteinization in the rat. *Endocrinology* **120**: 1928-1935 (1987)

**Heller RA, Krönke M.** Tumor necrosis factor-mediated signalling pathways. *J Cell Biol* **126**: 5-9 (1994)

**Hevel JM, White KA, Marletta MA.** Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **266**: 22789-22791 (1991)

**Hevel JM, Marletta MA.** Macrophage nitric oxide synthase: relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity. *Biochemistry* **31**: 7160-7165 (1992)

**Hibbs JB, Taintor RR, Chapman HA, Weinberg JB.** Macrophage tumor killing: Influence of the local environment. *Science* **197**: 279-287 (1977)

**Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z.** Macrophage cytotoxicity: Role for L<sub>1</sub> arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235**: 473-476 (1987).

**Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM.** Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* **157**(1): 87-94 (1988)

**Hoeffler JP, Meyer T, Yun Y, Jameson JL, Habener JF.** Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* **242**: 1430-1443 (1988)

**Honda S-I, Morohashi K-I, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T.** Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem* **268** : 7494-7502 (1993)

**Hsueh AJW, Billing H, Tsafiri A.** Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* **15**: 707-724 (1994)

**Hunter RHF, Poysler NL.** Ovarian follicular fluid concentration of prostaglandin E, F and I during preovulatory periods in pigs. *Reprod Nut Dev* **25**: 909-918 (1985)

**Hunzicker-Dunn M, Birnbaumer L.** Adenylyl cyclase activities in ovarian tissues III. Regulation of responsiveness to LH, FSH and PGE<sub>1</sub>, in the prepuberal, cycling pregnant and pseudopregnant rat. *Endocrinology* **99**: 198-210 (1976)

**Hurwitz A, Loukides J, Ricciarelli E, Botero L, Katz E, McAllister JM, Garcia JA, Rohan R, Adashi EY, Hernández ER.** The human intraovarian interleukin (IL-1) system: highly-compartmentalized and hormonally-dependent regulation of the genes encoding IL-1, its receptor, and its receptor antagonist. *J Clin Invest* **89**: 1746-1754 (1992)

**Hurwitz A, Hernández E, Payne DW, Dharmarajan AM, Adashi EY.** Interleukin-1 is both morphogenic and cytotoxic to cultured rat ovarian cells: obligatory role for

heterologous contact-independent cell-cell interaction. *Endocrinology* **131**: 1643-1649 (1992)

**Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, et al.** Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* **218**: 739-749 (1981)

**Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhri G.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 9265-9269 (1987).

**Ignarro LJ.** Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**: 535-560 (1990)

**Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP, Parker KL.** Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol* **7**: 852-860 (1993)

**Inagami T, Naruse M, Hoover R.** Endothelium as an endocrine organ. *Annu Rev Physiol* **57**: 171-189 (1995)

**Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, et al.** The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* **8**: 2302-2312 (1994)

**Jaffe ML, Munson PJ, Rodbard D.** Four parameter logistic curve-fitting program for the TI-59 calculator. National Institutes of Health Bethesda, MD, USA (1979)

**Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Block KD.** Cloning and expression of cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **267**: 14519-14522 (1992)

**Janzen EG, Wilcox AL, Manoharan V.** Reactions of nitric oxide with phenolic antioxidants and phenoxy radicals. *J Org Chem* **58**: 3597-3599 (1993)

**Janzen EG.** Nitric oxide reactivity. *Chem Eng News* **72**: 4 (1994)

**Kaipia A, Hsueh JW.** Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* **59**: 349-363 (1997)

**Karpinski BA, Morle GD, Huggenvik J, Uhler MD, Leiden JM.** Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4820-4824 (1992)

**Kasson BG, Meidan R, Davoren JB, Hsueh AJW.** Identification of subpopulations of rat granulosa cells: sedimentation properties and hormonal responsiveness. *Endocrinology* **117**: 1027-1034 (1985)

**Kasson B, Gorospe W.** Effect of interleukin 1,2 and 3 on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of rat granulosa cell in culture. *Mol Cell Endocrinol* **62**: 103-111 (1989)

**Kato M.** involvement of nitric oxide in growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH secretion in rat pituitary cells. *Endocrinology* **131**: 2133-2138 (1992)

**Kaufman S.** The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. *Proc Natl Acad Sci USA* **50**: 1085-1093 (1963)

**Kauffmann S.** The metabolic role of tetrahydrobiopterin; in Cooper BA, Whitehead VM (eds): *Chemistry and Biology of Pteridines*. Berlin, de Gruyter, pp 185-200 (1986)

**Kauffman S.** New tetrahydrobiopterin-dependent systems. *Annu Rev Nutr* **13** :261-286 (1993)

**Keeney DS, Ikeda Y, Waterman MR, Parker KL.** Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 gene expression in primitive gut of the mouse embryo does not require steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol* **9**: 1091-1098 (1995)

**Kentol CA, Cheng SVY, Nugent NP, Schewieckhardt RL, Roshenthal JL, Overton SA, Wands GD, Kuzeja JB, Luchette CA, Chappel SC.** The cloning of human FSH receptor and its expression in cos-7, CHO, Y-1 cells. *Mol Cell Endocrinol* **89**: 141-151 (1992)

**Kerler F, Ziegler I, Schmid C, Bacher A.** Synthesis of tetrahydrobiopterin in Friend erythroleukemia cells and its modulator effect on cell proliferation. *Exp Cell Res* **189**: 151-156 (1990)

**Khatsenko O, Kikkawa Y.** Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **280**: 1463-1470 (1997)

**Klatt P, Schmidt K, Mayer B.** Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. *Biochem J* **288**: 15-17 (1992)

**Knecht M, Katz MS, Catt KJ.** Gonadotropin-releasing hormone inhibits cyclic nucleotide accumulation in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* **256**: 34-36 (1981a)

- Knecht M, Amsterdam A, Catt KJ.** The regulatory role of cyclic AMP in hormone-induced granulosa cell differentiation. *J Biol Chem* **256**: 10628-10633 (1981b)
- Kown NS, Stuehr DH, Nathan CF.** Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* **174**: 761-767 (1994)
- Knowles RG, Moncada S.** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298**: 249-258 (1994)
- Koide M, Kawahara Y, Nakayama I, Tsuda T, Yokoyama M.** Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured smooth muscle cells: synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* **268**: 24959-24966 (1993)
- Koshimura K, Miwa S, Lee K, Fujiwara M, Watanabe Y.** Enhancement of dopamine release *in vivo* from the rat striatum by dialytic perfusion of 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin. *J Neurochem* **54**: 1391-1397 (1990)
- Koshland DE.** Editorial: The molecule of the year. *Science* **258**: 1861 (1992)
- Kowaluk EA, Seth P, Fung HL.** Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **262**: 916-922 (1992)
- Lala DS, Rice DA, Parker KL.** Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* **6**: 1249-1258 (1992)
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T.** Endothelial Nitric oxide Synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6348-6352 (1992)
- Laoide BM, Foulkes NS, Schlotter F, Sassone-Corsi P.** The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *EMBO J* **12**: 1179-1191 (1993)
- Laskin JD, Heck DE, Laskin DL.** Multifunctional role of nitric oxide in inflammation. *Trends Endocrinol Metab* **5**: 377-382 (1994)
- Leatherbarrow RJ.** Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. *Trends Biochem Sci* **15**: 455-458 (1990)
- Lee SH, Soyoola E, Chanmugan P, Sun H, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D.** Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophage stimulated with lipopolisachride. *J Biol Chem* **267**: 25934-25938 (1992)
- Leung PCK, Steele GL.** Intracellular signalling in the gonads. *Endocri Rev* **13**: 476-

499 (1992)

**Li Q, Bowmer CJ, Yates MS.** Diuretic effect of NG-nitro-L-arginine methyl ester in the rat. *J Pharm Pharmacol* **46**: 510-512 (1994)

**Loetscher H, Pan YCE, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W.** Molecular cloning and expression of human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* **61**: 351-359 (1990)

**Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A.** Tryptophan hydroxylase: measurement in pineal gland, brainstem and carcinoid tumor. *Science (Washington D.C.)* **155**: 217-219 (1967)

**Lowenstein CJ, Glatt CS, Brecht DS, Snyder SH.** Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6711-6715 (1992)

**Lowenstein CJ, Snyder SH.** Nitric oxide: a novel biologic messenger. *Cell* **70**: 705-707 (1992)

**Lui S, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans RW.** Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 1208-1213 (1993)

**Lüscher TF, Noll G.** The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* **118 (suppl)**: S81-S90 (1995)

**Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM.** Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* **267**: 6370-6374 (1992)

**Maier R, Bilbe G, Rediske J, Lotz M.** Inducible nitric oxide synthase from human articular chondrocytes: cDNA cloning and analysis of mRNA expression *Biochem Biophys Acta Enzym* **1208**: 145-150 (1994)

**McMillan K, Brecht DS, Hirsch DJ, Snyder SH, Clark JE, Master BS.** Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11141-11145 (1992)

**Marletta MA.** Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* **268**: 12231-12234 (1993)

**Marletta MA.** Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**: 927-930 (1994)

**Martel C, Labrie C, Dupont E, Couët J, Trudel C, Rhéaume E, Simard J, Luu-The V, Pelletier G, Labrie F.** Regulation of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase expression and activity in the hypophysectomized rat ovary: interactions between the stimulatory effect of human chorionic gonadotropin and the luteolytic effect of prolactin. *Endocrinology* **127**: 2726-2737 (1990)

**Marek WR, Eduardo S.** Nitric oxide - Biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis* **118**: S69-S80 (1995)

**Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T.** Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* **307**: 287-293 (1992)

**Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT.** Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* **268**: 17478-17488 (1993)

**Mataga N, Imamura K, Watanabe Y.** 6R-tetrahydrobiopterin perfusion enhances dopamine, serotonin, and glutamate outputs in dialysate from rat striatum and frontal cortex. *Brain Res* **551**: 64-71 (1991)

**Mayer B, John M, Böhme E.** Purification of a calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett* **277**: 215-219 (1990)

**Mayer B, John M, Heinzl B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, Böhme E.** Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxidoreductase. *FEBS Lett* **288**: 187-191 (1991)

**Mayer B, Brunner F, Schmidt K.** Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol* **45**: 367-374 (1993)

**McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Rosenblitt N, NiKolics K, Segaloff DL, Seeburg PH.** Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G-protein-coupled receptor family. *Science* **245**: 494-499 (1989)

**McMasters LM, Dickson LA, Shamy RV, Robischon K, Macdonald GJ, Moyle WR.** Rat cholesterol side-chain cleavage enzyme (P-450 scc) mRNA levels in ovarian granulosa cells. *Gene* **57**: 1-9 (1987)

**McMillan K, Bredt DS, Hirsch DK, Snyder SH, Clark JE, Masters BS.** Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11141-11145 (1992)

**Meyer TE, Habener JF.** Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. *Endocr Rev* **14**: 269-290 (1993)

**Miller WL.** Molecular biology of steroid hormone biosynthesis. *Endocr Rev* **9**: 295-318 (1988)

**Minegish T, Nakamura T, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y, Igarashi M.** Cloning and sequencing of the human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **172**: 1049-1054 (1990)

**Minegish T, Nakamura T, Takakura Y, Ibuki Y, Igarashi M.** Cloning and sequencing of the human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **175**: 1125-1130 (1991)

**Mitchell HH, Shonle HA, Grindley HS.** The origin of nitrate in the urine. *J Biol Chem* **24**: 461 (1916)

**Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P.** Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* **75**: 875-886 (1993)

**Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**: 109-142 (1991)

**Moncada S, Higgs A.** The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Eng J Med* **329**: 2002-2012 (1993)

**Moore CCD, Miller WL.** The role of transcriptional regulation in steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Biol* **40**: 517-525 (1991)

**Morris SM, Billiar TR.** New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* **266**: E829-E839 (1994)

**Morris KJ, Richards J.** Luteinizing hormone induces prostaglandin endoperoxide H synthase-2 and luteinization *in vitro* by A-kinase and C-kinase pathways. *Endocrinology* **136**: 1549-1558 (1995)

**Mukherjee A, Park-Sarge OK, Mayo KE.** Gonadotropins induce rapid phosphorylation of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **137**: 3234-3245 (1996)

**Myatt L, Brockman DE, Eis A, Pollock JS.** Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta* **14**: 487-495 (1993)

**Nakane M, Schmidt HHHW, Pollock JS, Förstermann U, Murad F.** Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* **316**: 175-180 (1993)

**Nakayama DK, Geller DA, Di Silvio M, Bloomgarden G, Davies P, Pitt BR, Hatakeyama K, Kagamiyama Y, Simmons RL, Billiar TR.** Tetrahydrobiopterin synthesis and inducible nitric oxide production in pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* **266**: L455-460 (1994)

**Nahum R, Beyth Y, Chun SY, Hsueh AJW, Tsafiriri A.** Early onset of deoxyribonucleic acid fragmentation during atresia of preovulatory ovarian follicles in rats. *Biol Reprod* **55**: 1075-1080 (1996)

**Nathan C, Hibbs JB.** Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* **3**: 65-70 (1991)

**Nathan C.** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB (Fed Am Soc Exp Biol) J* **6**: 3051-3064 (1992)

**Nathan C, Xie QW.** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* **269**: 13725-13728 (1994)

**Nebert DW, Nelson DR.** The P450 superfamily: Updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA* **8**: 1-4 (1989)

**Nichol CA, Lee CL, Edelstein MP, Chao JY, Duch DS.** Biosynthesis of tetrahydrobiopterin by *de novo* and salvage pathways in adrenal medulla extracts, mammalian cell cultures, and rat brain *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 1546-1550 (1983)

**Nichol CA, Smith GK, Duch DS.** Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Ann Rev Biochem* **54**: 729-764 (1985)

**Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ.** Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* **90**: 2092-2096 (1992)

**Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S.** Cloning of inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* **191**: 89-94 (1993)

**Nüssler AK, Billiar TR.** Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukocyte Biol* **54**: 171-178 (1993)

**Nüssler AK, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R,**

**Madariaga J, Simmons RL.** Stimulation of the NO synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* **176**: 261-264 (1992)

**Oguro T, Kaneko E, Numazawa S, Imaoka S, Funae Y, Yoshida T.** Induction of hepatic heme oxygenase and changes in cytochrome P-450s in response to oxidative stress produced by stilbenes and stilbene oxides in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **280**: 1455-1462 (1997)

**Ohue T, Koshimura K, Lee K, Watanabe Y, Miwa S.** A novel action of 6R-L-erythro-5:6,7,8-tetrahydrobiopterin, a cofactor for hydroxylases of phenylalanine, tyrosine and tryptophan: enhancement of acetylcholine release *in vivo* in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* **128**: 93-96 (1991)

**Oonk RB, Krasnow JS, Beattie WG, Richards JS.** Cyclic AMP-dependent and independent regulation of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 (P-450<sub>sc</sub>) in rat ovarian granulosa cells and corpora lutea. *J Biol Chem* **264**: 21934-21942 (1989)

**Orly J, Rei Z, Greenberg NM, Richards JS.** Tyrosine kinase inhibitor AG18 arrests follicle stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation: use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for multiple messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* **134**: 2336-2346 (1994)

**Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature Lond* **327**: 523-526 (1987)

**Padmaja S, Huie RE.** The reaction of nitric oxide with organic peroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Commun* **195**: 539-544 (1993)

**Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of the endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 523-526 (1987)

**Palmer RMJ, Asthon DS, Moncada S.** Endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**: 664-666 (1988)

**Palmer RMJ, Moncada S.** A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **158**: 348-359 (1989)

**Park OK, Mayo KE.** Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Endocrinol* **5**: 967-969 (1991)

- Parker KL, Schimmer BP.** The roles of the nuclear receptor steroidogenic factor 1 in endocrine differentiation and development. *Trends Endocrinol Metab* **7**: 203-207 (1996)
- Peunova N, Enikolopov G.** Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* **364**: 450-453 (1993)
- Picardo-Leonard J, Miller WL.** Homologous sequences in steroidogenic enzymes, steroid receptors and a steroid binding protein, suggest a consensus steroid binding sequence. *Mol Endocrinol* **2**: 11454-1150 (1990)
- Pollock JS, Werner ER, Mitchell JA, Förstermann U.** Particulate endothelial nitric oxide synthase: requirement and content of tetrahydrobiopterin, FAD and FMN. *Endothelium* **1**: 147-152 (1993)
- Pollock JS, Förstermann U, Mitchel JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F.** Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10480-10484 (1991)
- Prütz WA, Möning H, Butler J, Land EJ.** Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidations of tyrosine units in peptides and proteins. *Arch Biochem Biophys* **243**: 125-134 (1985)
- Radi R, Rodriguez M, Castro L, Telleri R.** Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch biochem Biophys* **308**: 89-95 (1994)
- Radomski MW, Rees DD, Dutra A, Moncada S.** S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **107**: 745-749 (1992)
- Radomski MW, Salas E.** Nitric oxide-biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **118 (suppl)**: S69-S80 (1995)
- Rand MJ, Li CG.** Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheal nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu Rev Physiol* **57**: 659-682 (1995)
- Ranta T, Knecht M, Darbon J-M, Baukal AJ, 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)
- Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 3375-3378 (1989)

- Reh fuss RP, Walton KM, Loriaux MM, Goodman RH.** The cAMP-regulated enhancer-binding protein ATF-1 activates transcription in response to cAMP-dependent protein kinase A. *J Biol Chem* **266**: 18431-18434 (1991)
- Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM.** Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10130-10134 (1993)
- Richards JS.** Maturation of ovarian follicles actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* **60**: 51-89 (1980)
- Richards JS, Haddox M, Tash JS, Walter U, Lohmann S.** Adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase and granulosa cell responsiveness to gonadotropins. *Endocrinology* **114**: 2190-2198 (1984)
- Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica JM, Goldring NB.** Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res* **43**: 231-276 (1987)
- Richards JS.** Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* **15**: 725-751 (1994)
- Richards JS, Fitzpatrick SL, Clemens JW, Morris JK, Alliston T, Sirois J.** Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Recent Prog Horm Res* **50**: 223-254 (1995)
- Richter c, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffe M.** Oxidants in mitochondrial: from physiology to diseases. *Biochem Biophys Acta* **1271**: 67-74 (1995)
- Roby KF, Teranova PF.** Tumor necrosis factor alpha alters follicular steroidogenesis *in vitro*. *Endocrinology* **123**: 2952-2954 (1988)
- Roby KF, Terranova PF.** Effects of tumor necrosis factor-1 $\alpha$  *in vitro* on steroidogenesis of healthy and atretic follicle of the rat: theca as a target. *Endocrinology* **126**: 2711-2718 (1990)
- Rodbard D, Tacey RL.** Radioimmunoassay dose interpolation based on the mass action law with antibody heterogeneity. *Anal Biochem* **90**: 13-21 (1978)
- Rubbo HR, Radi M, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA.** Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipids. *J Biol Chem* **269**: 226066-26075 (1994)

**Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Curie MG, Needleman P.** Nitric oxide activates cyclooxygenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7240-7244 (1993)

**Sancho-Tello M, Chen T-Y, Clinton TK, Lyles R, Moreno RF, Tilzer L, Imakawa K., Terranova PF.** Evidence for lipopolysaccharide binding in human granulosa-luteal cells. *J Endocrin* **135**: 571-578 (1992).

**Sane DC, Bielawska A, Greenberg CS, Hannun YA.** Cyclic GMP analogs inhibit gamma thrombin-induced arachidonic acid release in human platelets. *Biochem Biophys res Commun* **165**: 708-714 (1989)

**Santana P, Llanes L, Hernández I, Gallardo G, Quintana J, González J, Estévez F, Ruiz De Galarreta CM, Fanjul LF.** Ceramide mediates tumor necrosis factor effect on P450-aromatase activity in cultured granulosa cells. *Endocrinology* **136**: 2345-2348 (1995)

**Santana P, Llanes L, Hernández I, González-Robayna I, Tabraue C, González-Reyes J, Quintana J, Estévez F, Ruiz de Galarreta CM, Fanjul LF.** Interleukin 1- $\beta$  stimulates sphingomyelin hydrolysis in cultured granulosa cells: evidences for a regulatory ceramide on progesterone and prostaglandin biosynthesis. *Endocrinology* **137**: 2480-2489 (1996)

**Schmidt HHHW, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Förstermann U, Murad F.** Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 365-369 (1991)

**Schmidt K, Werner ER, Mayer B, Wachter H, Kukovetz WR.** Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. *Biochem J* **281**: 297-300 (1992)

**Schmidt HHW, Warner TD, Ishii K, Sheng H, Murad F.** Insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells caused by L-arginine-delivered nitrogen oxides. *Science* **255**: 721-723 (1992)

**Schobersberger W, Hoffmann G, Hobisch-Hagen P, Böck G, Völkl H, Baier-Bitterlich G, Wirleitner B, Wachter H, Fuchs D.** Neopterin and 7,8-dihydroneopterin induce apoptosis in the rat alveolar epithelial cell line L2. *FEBS Letters* **397**: 263-268 (1996)

**Schott K, Brand K, Hatakeyama K, Kagamiyama H, Maier J, Werner T, Ziegler I.** Control of cell-cycle-associated tetrahydrobiopterin synthesis in rat thymocytes. *Exp Cell Res* **200**: 105-109 (1992)

**Scott-Burden T, Elizondo G, Ge T, Boulanger CM, Vanhoutte PM.** Simultaneous

activation of adenyl cyclase and protein kinase C induces production of nitric oxide by vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **46**: 274-282 (1994)

**Segaloff DL, Ascoli M.** The lutropin/Choriogonadotropin receptor, 4 years later. *Endocr Rev* **14**: 324-347 (1993)

**Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ.** Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **267**: 15274-15276 (1992).

**Sessa WC, Barber CM, Lynch KR.** Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein. *Circ Res* **72**: 921-924 (1993)

**Schall T, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC, Wong GHW, Gatanaga T, Granger GA, Leutz R, Rabb H, Kohr WJ, Goedell DV.** Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* **61**: 361-379

**Sheng H, Schmidt HHHW, Nakane M, Mitchell JA, Pollock JS, Förstermann U, Murad F.** Characterization and localization of nitric oxide synthase in non-adrenergic non-cholinergic nerves from bovine retractor penis muscles. *Br J Pharmacol* **106**: 768-773 (1992)

**Sherman PA, Laubach VE, Reep BR, Wood ER.** Purification and cDNA sequenmce of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry* **32**: 11600-11605 (1993)

**Shiman R, Akino M, Kaufman S.** Solubilization and partial purification of tyrosine hydroxylase from bovine adrenal medulla. *J Biol Chem* **246**: 1330-1340 (1971)

**Shimokawa T, Smith WL.** Essential histidines of prostaglandin endoperoxide synthase. His-309 is involved in heme binding. *J Biol Chem* **265**: 5192-5198 (1990)

**Shukowski L, Tsafiriri A.** The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* **135**: 2287-2290 (1994)

**Shun SY, Billing H, Tilly J, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh AJW.** Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory folllicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* **135**: 1845-1853 (1994)

**Simón C, García-Velazco JA, Polan ML.** Cytokines and reproductive function. *Cur Opin Endocrin Diabet* **3**: 463-471 (1996)

**Simpson E, Lauber M, Demeter M, Means G, Mahendroo M, Kilgore M, Mendelson C, Waterman M.** Regulation of expression of genes encoding

steroidogenic enzymes in the ovary. *J Steroid Biochem Molec Biol* **40**: 409-413 (1992)

**Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Calotta F, Re F, Annotovani A, Shanenbeck K, Crabstein KH, Dower SK.** Interleukin signalling occurs exclusively via type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6155-6159 (1993)

**Sirois J, Simmons DL, Richards JS.** Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. *J Biol Chem* **237**: 11586-11592 (1992)

**Sirois J, Richards JS.** Transcriptional regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase gene in rat granulosa cells. *J Biol Chem* **268**: 21931-21938 (1993)

**Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, Goodwin RG.** A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* **248**: 1019-1023 (1990)

**Southan GA, Szabó C, Thiemermann C.** Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. *Br J Pharmacol* **144**: 510-516 (1995)

**Stammler JS.** Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* **78**: 931-936 (1994)

**Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J.** Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**: 1898-1902 (1992)

**Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J.** Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7674-7677 (1992)

**Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pévet P, Sassone-Corsi P.** Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* **365**: 314-320 (1993)

**Stone, JR, Marletta MA.** Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* **33**: 5636-5640 (1994)

**Stone, JR, Sands RH, Dunham WR, Marletta MA.** Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **207**: 572-577 (1995)

**Strohmaier W, Redl H, Schlag G, Inthorn D.** D-erythro-neopterin plasma levels in intensive care patients with and without septic complications. *Crit Care Med* **15**: 757-760 (1987)

**Stuehr DJ, Marletta DA.** Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 7738 (1985).

**Stuehr DJ, Kwon NS, Gross SS, Thiel BA, Levi R, et al.** Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol: requirement for inducible and constitutive components. *Biochem Biophys Res Commun* **161**: 420-426 (1989)

**Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF.** FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 558-567 (1990)

**Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, and Nathan CF.** Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7773-7777 (1991)

**Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J.** N-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* **266**: 6259-6263 (1991)

**Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzalez JA, et al.** Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J* **5**: 98-103 (1991)

**Stuehr DJ, Griffith OW.** Mammalian nitric oxide synthases. In *Advances in Enzymology*, ed, Meister A. New York: Wiley. 287-346 (1992)

**Stuehr DJ.** Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 339-359 (1997)

**Su X, Sullivan TF, Burstjan S, Berman SA.** Optimized chemiluminescent detection of DNA amplified in the exponential phase of PCR. *BioTechniques* **17**: 734-736 (1994)

**Tabraue C, Diaz-Peñate R, Gallardo G, Hernandez I, Quintana J, Lopez-Blanco F, Gonzalez-Reyes J, Fanjul LF, Ruiz de Galarreta CM.** Induction of guanosine triphosphate-Cyclohydrolase by follicle-stimulating hormone enhances interleukin-1 $\beta$ -stimulated nitric oxide synthase activity in granulosa cells. *Endocrinology* **138**: 162-168 (1997)

**Tanaka K, Kaufman S, Milstein S.** Tetrahydrobiopterin, the cofactor for aromatic aminoacid hydroxylases is synthesized by and regulates proliferation of erythroid cells.

Proc Natl Acad Sci U.S.A. **86**: 5864-5867 (1989)

**Tayeh MA, Marletta MA.** Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. *J Biol Chem* **264**: 19654-19658 (1989)

**Tarpey MM, Beckman JS, Ischiropoulos H, Gore JS, Brock TA.** Peroxynitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis. *FEBS Lett* **364**: 314-318 (1995)

**Tetsuka T, Daphna-Iken D, Miller BW, Guan Z, Baier LD, Morrison AR.** Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest* **97**: 2051-2056 (1996)

**Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava SK, Baier LD, Dumain J, Morrison AR.** Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 12168-12172 (1994)

**Tilly JL, Billing H, Kowalski KI, Hsueh AJW.** Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat granulosa cells and follicles by tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* **6**: 1942-1950 (1992)

**Tilly JA, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL.** Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* **6**: 1942-1950 (1992)

**Tilly JA, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL.** Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 messenger RNA levels. *Endocrinology* **136**: 232-241 (1995)

**Tonnetta SA, Di Zerega GS.** Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr Rev* **10**: 205-222 (1989)

**Tsafiri A, Chun SY, Reich R.** Follicular rupture and ovulation. In: Adashi, EY, Leung, PPK (eds) *The Ovary*, Raven Press, New York, pp 227-224 (1993)

**Umans JG, Levi R.** Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Annu Rev Physiol* **57**: 771-790 (1995).

**Vallejo M, Gosse ME, Beckman W, Habener JF.** Impaired cyclic AMP-dependent phosphorylation renders CREB a repressor of C/EBP-induced transcription of the somatostatin gene in an insulinoma cell line. *Mol Cell Biol* **15**: 415-424 (1995)

**Van Vooris BJ, Dunn MS, Snyder GD, Weiner CP.** Nitric oxide: An autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology* **135**: 1799-1806 (1994)

**Vargas HM, Cuevas JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G.** Comparison of the inhibitory potencies of N(G)-methyl-, N(G)-nitro- and N(G)-amino-L-arginine on EDRF function in the rat: Evidence for continuous basal EDRF release. *J Pharmacol Exp Ther* **257**: 1208-1215 (1991)

**Vilcek J, Lee TH.** Tumor necrosis factor: new insights into the molecular mechanism of its multiple actions. *J Biol Chem* **266**: 7313-7316 (1991)

**Waeber G, Habener JF.** Nuclear translocation and DNA recognition signals colocalized within the bZIP domain of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein CREB. *Mol Endocrinol* **5**: 1431-1438 (1991)

**Wadzinski BE, Wheat WH, Jaspers S, Peruski LF, Lickteig RL, Johnson GL, Klemm DJ.** Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Molecular and Cellular Biology* **13**: 2822-2834 (1993)

**Wallach EE, Atlas SJ, Dhamaranjun AM, Oski JA, Santalli R.** The periovulatory interval: Physiological and endocrinological implications. In: Yoshinaga K, Mori T (eds). *Embryos and their Environment* Liss, New York, pp 87-100 (1989)

**Wang H, Ascoli M, Segaloff DL.** Multiple luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology* **129**: 133-138 (1991)

**Wang H, Nelson S, Ascoli M, Segaloff DL.** The 5'-flanking region of the rat luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene confers Leydig cell expression and negative regulation of gene transcription by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate. *Mol Endocrinol* **6**: 320-326 (1992)

**Waterman MR.** Biochemical diversity of cAMP-dependent transcription of steroid hydroxylase genes in the adrenal cortex. *The Journal Of Biological Chemistry* **269**: 27783-27786, (1994)

**Weiss G, Goossen B, Doppler W, Fuchs D, Pantopoulos K, Werner-Felmayer G, Wachter H, Hentze MW.** Translational regulation via iron-responsive elements by the nitric oxide/NO-synthase pathway. *Embo J* **12**:3651-3657 (1993)

**Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H.** Tetrahydrobiopterin and cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med* **203**: 1-12 (1993)

**Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H.** Tetrahydrobiopterin-dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts. *J Exp Med* **172**: 1599-1607 (1990)

**Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Schmidt K, Weiss G, Wachter H.** Pteridine biosynthesis in human endothelial cells. Impact on nitric oxide-mediated formation of cyclic GMP. *J Biol Chem* **268**: 1842-1846 (1993)

**White KA, Marletta MA.** Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* **31**: 6627-6631 (1992)

**Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, Keefer JK.** DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* **254**: 1001-1003 (1991)

**Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, Laval F, Nims RW, Laval J, Cook J, Pacelli R, Liebmann J, Krishna M, Ford PC, Mitchell JB.** Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Current Topics in Cellular Regulation* **34**: 159-187 (1996)

**Witty JP, Bridgham JT, Jonshon AL.** Induction of apoptotic cell death in hen granulosa cells by ceramide. *Endocrinology* **137**: 5269-5277 (1996)

**Wolf WA, Ziaja E, Arthur Jr. RA, Anastasiadis PZ, Levine RA, Kuhn DM.** Effect of tetrahydrobiopterin on serotonin synthesis, release, and metabolism in superfused hippocampal slices. *J Neurochem* **57**: 1191-1197 (1991)

**Wong WYL, Richards JS.** Induction of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **130**: 3512-3521 (1992)

**Wood ER, Berger HJ, Sherman PA, Lapetina EG.** Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* **191**: 767-774 (1993)

**Xiao S, Findlay JK.** Modulation of differentiation of rat granulosa cell *in vitro* by interferon-gamma. *J Endocrinol* **133**: 131-139 (1992)

**Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C.** Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**: 225-228 (1992)

**Yoshimura Y, Wallach EE.** Studies on the mechanism(s) of mammalian ovulation.

Fertil Steril **47**: 22-34 (1987)

**Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C.** Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. J Biol Chem **266**: 12544- 12547 (1991)

**Zhang J, Snyder SH.** Nitric oxide in the nervous system. Annu Rev Pharmacol Toxicol **35**: 213-233 (1995)

**Zhang P, Mellon SH.** The orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 regulates the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated transcriptional activation of rat cytochrome P450c17 (17 -hydroxylase/c17-20 lyase). Mol Endocrinol **10**: 147-158 (1996)

**Zhu M, Hirayama K, Kapatos G.** Regulation of tetrahydrobiopterin biosynthesis in cultured dopamine neurons by depolarization and cAMP. J Biol Chem **269**: 11825-11829 (1994)

**Ziegler I, Kolb HJ, Bodenberger U, Wilmann W.** Biopterin level in blood cells as a marker for hemopoietic cell proliferation during autologous bone marrow transplantation in beagle dogs. Blut **44**: 261-270 (1982)

**Ziegler I, Schwulara U, Ellwart J.** Pteridines are produced during interleukin 2-induced T-cell proliferation and modulate transmission of this signal. Exp Cell Res **167**: 531-538 (1986)