

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**REGULACIÓN DEL CICLO DE LA FOSFATIDILCOLINA
EN CÉLULA GRANULOSA OVÁRICA**

MARÍA DEL PINO SANTANA DELGADO

Las Palmas de Gran Canaria, julio de 1993

40-1992/93

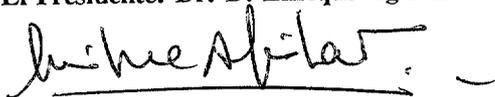
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

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

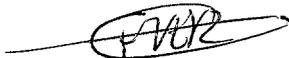
Terminada la lectura y contestadas por la Doctoranda las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTD "CUM LAUDE"

Las Palmas de G. C., a 24 de Septbre. de 1993.

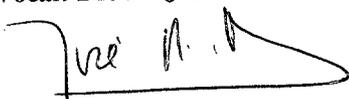
El Presidente: Dr. D. Enrique Aguilar Benítez de Lugo,



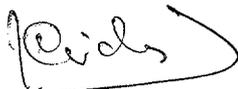
El Secretario: Dr. D. Francisco Estévez Rosas,



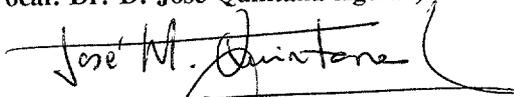
El Vocal: Dr. D. José Pérez Pérez,



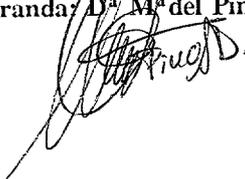
El Vocal: Dr. D. Jacobo Cárdenes Torres,



El Vocal: Dr. D. José Quintana Aguiar,



En Doctoranda: D^a M^a del Pino Santana Delgado,



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
LAS PALMAS DE G. CANARIA	
N.º Documento	341.532
N.º Copia	341.535

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA SALUD

REGULACION DEL CICLO DE LA FOSFATIDILCOLINA EN CELULA
GRANULOSA OVARICA

M^a DEL PINO SANTANA DELGADO

1993

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DOCTORADO EN MEDICINA.

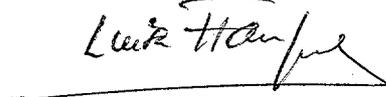
DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGIA CEL. Y MOL.
PROGRAMA DE MECANISMOS. CEL. Y MOL. DE ACCION
HORMONAL

TITULO DE LA TESIS
REGULACION DEL CICLO DE LA FOSFATIDILCOLINA EN CELULA GRANULOSA
OVARICA

Tesis Doctoral presentada por Dña. M^a. del Pino Santana Delgado.
Dirigida por el Dr. Dña. Luisa Fernanda Fanjul Rodriguez.....

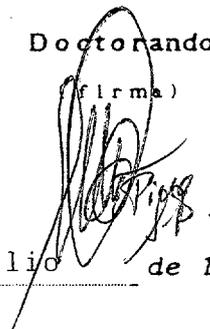
El Director,

(firma)



El Doctorando,

(firma)



Las Palmas de Gran Canaria, a 16 de Julio de 1993

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Dra. Luisa Fernanda Fanjul Rodríguez y al Dr. Carlos Manuel Ruiz de Galarreta Hernández por la excelente labor realizada en la dirección de esta Tesis.

A Nanda mi especial agradecimiento por su constante ayuda en la orientación y desarrollo de este trabajo. También quiero que sepas el gran valor que tiene para mí haber contado en todo momento con tus conocimientos científicos y humanos.

A Manolo por hacer posible lo que en un principio era para mí un sueño y haber encaminado mi trayectoria profesional y científica.

A Juan González y Pepe Quintana por su acogida, apoyo y dedicación desinteresada en los comienzos de mi trabajo en este laboratorio.

A los compañeros/os del Departamento: las "niñas" Vandi Hernández, Luz LLanes, Pilar Bracero y Sonia Valido; y a los "niños" Paco Estévez, Juan González, Javier Cabrera, Ignacio González, Germán Gallardo, Carlos Tabraue y Félix Cabrera mi agradecimiento por la ayuda en el trabajo realizado, los ratos de café y las horas prestadas que han hecho más fácil y posible la realización de este trabajo.

A mi familia, a Mariola Pérez y José Torres por su ayuda, comprensión y apoyo desinteresado en estos años.

A la Universidad de Las Palmas de G.C. por las ayudas concedidas para la realización de los cursos del tercer ciclo.

A mis padres

INDICE

1.	INTRODUCCION	
1.1	Fisiología del ovario y la célula granulosa folicular	1
1.2	La señalización intracelular de la proliferación y diferenciación de la célula granulosa	8
1.3	El recambio de fosfatidilcolina en la señalización intracelular de respuestas a largo	13
2.	OBJETIVOS	22
3.	MATERIAL Y METODOS	
3.1	Productos utilizados	24
3.2	Obtención, cultivo y marcaje de células granulosa y MA-10	26
3.3	Extracción, separación y cuantificación de fosfolípidos y metabolitos acuosos	28
3.4	Determinación de proteína quinasa C	34
3.5	Métodos estadísticos	35
4.	RESULTADOS	
4.1	Regulación por FSH de la síntesis de fosfatidilcolina	36
4.2	Efectos del LHRH sobre el ciclo de la fosfatidilcolina	52
5.	DISCUSION	63
6.	CONCLUSIONES	70
7.	BIBLIOGRAFIA	71

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona corticotropa
AMPC	3',5' Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
AVP	Arginina-vasopresina
But₂cAMP	Dibutiril AMPC
Ca²⁺	Ion calcio
SCC P450	Enzima desramificante del colesterol citocromo P450
DAG	Diacilglicerol
DES	Dietilestilbestrol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FSH	Hormona Folículo estimulante
hCG	Hormona gonadotropina coriónica humana
IGFs	Factores de crecimiento semejante a la insulina (I y II)
IP₃	Inositol 1,4, 5 trifosfato
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
3β-HSD	Enzima 3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - Δ^4 Isomerasa (E.C. 1.1.1.51)
PA	Acido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMA	Forbol ester, miristato-acetato
PRL	Prolactina
20α-OH-Pro	20 α -hidroxi-preg-4-en-3-ona, 20 α -hidroxiprogesterona
PS	Fosfatidilserina
TCA	Acido tricloroacético
tPA	Activador del plasminógeno tisular

INTRODUCCION

1.1 Fisiología del ovario y la célula granulosa folicular

El hecho fundamental de la fisiología ovárica, lo constituye la maduración del folículo, su ruptura para permitir la ovulación, y su posterior transformación en cuerpo lúteo. La incógnita más importante en la comprensión de la fisiología del ovario la constituye la forma en la que se produce la selección de uno o varios folículos concretos, de entre los que en cada ciclo ovárico inician su maduración. La resolución de esta incógnita, proporcionaría además la respuesta a otro de los interrogantes que aún persisten acerca de la función ovárica: cómo se produce la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo durante cada ciclo (Centolo GM, 1983; Greenwald GS, Terranova PF, 1988; Kenigsberg D, et al 1989).

La conclusión de la maduración folicular, es inseparable de la finalización con éxito de otro proceso, el de proliferación y diferenciación de las células contenidas en el interior del folículo, las células granulosa. Las células granulosa ováricas experimentan un corto e intenso proceso proliferativo, durante el cual se multiplican desde una única capa, que recubre el interior del folículo primordial, hasta formar múltiples capas que rodean el oocito al cual sirven de sosten.

Cuando la intensidad de la multiplicación celular disminuye, se inicia la diferenciación, que transforma a una célula epitelial, sin una función definida, en otra con una morfología típica de célula con procesos de secreción intensa. A lo largo de su diferenciación, la célula granulosa, expresa receptores de membrana a hormonas hipofisarias, factores de crecimiento y citoquinas (Richards JS, 1980; Hsueh et al, 1983; Hsueh et al, 1984). Y, activada por las moléculas para las que expresa receptores, sintetiza hormonas esteroideas, péptidos reguladores, proteínas que forman la matriz extracelular del oocito, y enzimas líticos, que participaran en la digestión de la pared folicular, que precede a la ovulación (Amsterdam A, Rotmensch S, 1987; Amsterdam A et al, 1989; Toneta S, Dizerega GS, 1989).

Proliferación y diferenciación, tienen lugar en la célula granulosa, como consecuencia

de un delicado equilibrio entre influencias hormonales endocrinas, paracrinas y autocrinas, aunque existen diferencias en el nivel de conocimientos acumulados hasta el presente, sobre la regulación de ambos fenómenos.

La diferenciación de la granulosa, es un proceso relativamente bien comprendido debido en gran medida, a la existencia de un modelo experimental adecuado, el cultivo de estas, en medio libre de suero (Erickson GF, 1983), conservando la capacidad de adquirir prácticamente todas las funciones que caracterizan a la célula diferenciada en el interior del folículo.

Los cultivos, se establecen a partir de células obtenidas de ratas inmaduras tratadas con dietilestilbestrol (DES), y mantenidas en medio libre de suero, y son un excelente modelo experimental porque, i) Se obtiene un elevado número de células por ovario sin necesidad de emplear colagenasa que daña las membranas celulares, ii) Se consigue una población celular homogénea, indiferenciada y representativa de la existente en los folículos preantrales, iii) La ausencia de suero permite controlar las variables hormonales adecuadamente.

En estas condiciones experimentales, las células granulosa pueden ser diferenciadas y luteinizadas, y constituyen junto con los linfocitos, las únicas células no tumorales, cuyo proceso de diferenciación puede ser reproducido *in vitro*, con la aparición de cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos análogos a los que tienen lugar *in vivo*.

Así ha podido probarse, que la hormona folículo estimulante (FSH), la principal reguladora de las distintas fases de maduración folicular, regula asimismo la diferenciación de la célula granulosa ovárica, que *in vitro* experimenta bajo sus efectos los mismos cambios morfológicos, que los que tienen lugar en el folículo, y que podrían resumirse en: i) Adquisición de una forma cuboidal o esférica, con prolongaciones citoplasmáticas, diferente de la epitelial aplanada y lisa del folículo primordial, ii) Aparición de *gap junctions*, base anatómica de la comunicación intercelular entre estas células, a través de las cuales iones y

moléculas de bajo peso, como los mensajeros intracelulares y los esteroides, se transferirían de una célula a otra, iii) Cambios en los orgánulos citoplasmáticos y el citoesqueleto, compatibles con la aparición de una intensa actividad esteroidogénica y secretora (Amsterdam et al, 1981; Carnegie et al, 1987).

En la regulación del proceso diferenciador, la FSH es auxiliada, por un sinnúmero de moléculas. Para permitir esta complicada modulación la FSH induce previamente y en forma sucesiva: i) Receptores homólogos para la propia hormona (Richards JS et al, 1976; Vidyashankar N, Mougdal NR, 1984), ii) Receptores para LH/hCG (Erickson GF et al, 1979; May JV et al, 1980), iii) Mantiene los receptores al LHRH e induce receptores a la PRL (Wang C et al, 1979; Ranta T et al, 1982), iv) Induce receptores a la Insulina, el IGF-I, TGF- β y EGF (Adashi EY et al, 1985; Bendrell JJ, Dorrington J, 1988; St Arnaud R, 1983), v) Induce receptores a andrógenos, estrógenos y progestágenos, todas ellas moléculas que participaran en la regulación de la diferenciación de la célula (Richards JS, 1975; Schreiber JR, Ross GT, 1976).

El proceso diferenciador se caracteriza también por la adquisición de la capacidad de sintetizar moléculas que no pueden ser producidas por la granulosa del folículo primordial, y sí por las células que se encuentran en el folículo durante las distintas fases de su desarrollo. La FSH induce sucesivamente, i) La P450_{AROM}, que cataliza la conversión de andrógenos procedentes de la teca, para producir estrógenos, fundamentalmente 17 β -estradiol (Erickson GF, Hsueh AJW, 1978; Hickey GJ et al, 1990), ii) El enzima desramificante del colesterol (CSCC) (Toaff ME et al, 1983), iii) La 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) (Jones PBC, Hsueh AJW, 1982), Δ^{4-5} -isomerasa, que en la célula granulosa cataliza únicamente el paso de pregnenolona a progesterona, iv) Inhibe la 20 α -hidroxilasa que metaboliza progesterona a 20 α -OH progesterona (Jones PBC, Hsueh AJW, 1981; Moon YS et al, 1985).

Además la FSH, induce o estimula la síntesis de IGF-I (Hernandez ER et al, 1989), Proteoglicanos que forman la matriz extracelular, y Activador del plasminógeno tisular (tPA)

(Shaw KJ et al, 1985), cuya actividad de colagenasa disminuye la viscosidad del líquido folicular, y produce la lisis de la pared del folículo durante la ovulación.

La LH es la hormona responsable de la diferenciación terminal o luteinización de la célula granulosa. Su papel como hormona reguladora de este proceso, está necesariamente subordinado al hecho de que la célula en los estadios iniciales de diferenciación, no posee receptores para esta gonadotropina. La luteinización se caracteriza básicamente por la pérdida gradual de los receptores para la FSH, y la especialización en la producción de progesterona.

Los efectos generales de la LH pueden esquematizarse como: i) Disminución de las *gap junctions*, que permite una disgregación de las células granulosa, posibilitando la liberación del óvulo (Larsen WJ, 1981), ii) Inducción de la síntesis de ciertas proteínas como la inhibina, relaxina y tPA (Wang C, 1983), importantes para el éxito de lo que constituye la función folicular fundamental, la ovulación (Loexen MR, 1983), iii) Aumento de la síntesis de estradiol y sobre todo de progesterona, que completaran los cambios uterinos necesarios para la implantación del huevo, y el mantenimiento de las primeras fases de la gestación y, regularan la producción hipofisaria de las gonadotropinas (Behrman HR, Armstrong AT, 1969; Madej E, 1980; Rodgers RJ et al, 1986).

Finalmente, tanto los estrógenos como el IGF-I, amplifican los efectos de la FSH. El estradiol, es capaz de inducir proliferación de las células granulosa, en animales hipofisectomizados. En células mantenidas en cultivo, los estrógenos y el IGF-I, multiplican los efectos de la FSH sobre la inducción de P450_{AROM}, y la 3 β -HSD, y por tanto aumentan la síntesis de 17 β -estradiol y progesterona, y la inducción de receptores homólogos para la FSH y heterólogos para la LH y los propios estrógenos. Así pues la adquisición temprana de la capacidad de sintetizar estrógenos e IGH-I, por parte por las células de un folículo o folículos determinado, aumenta las posibilidades de ese folículo/s, de concluir el proceso ovulatorio (Goldenberg RL et al, 1972; Adashi EY, Hsueh AJW, 1982; Adashi EY et al, 1985; Adashi et al, 1986).

Sin embargo, el éxito de la diferenciación de la célula granulosa y de la maduración folicular, no depende exclusivamente de la correcta interacción de los factores que estimulan el proceso, sino de la no concurrencia en el momento preciso de los efectos de otra serie de moléculas que frenan e interrumpen la diferenciación celular, y conducen al folículo a la atresia.

La interrupción de la diferenciación de la célula granulosa, tiene como protagonistas a tres moléculas muy diferentes, una hormona hipofisaria, la prolactina (PRL), un factor de crecimiento, el EGF, y un péptido producido en el ovario, con estructura y receptores similares al LHRH hipotalámico. El EGF, la PRL y, sobre todo el LHRH, previenen todos los cambios morfofuncionales inducidos por la FSH, que caracterizan la diferenciación de la granulosa (Hsueh AJW et al, 1981; Hsueh AJW, Jones PBC, 1981).

El carácter antigonadotrópico de la PRL es sobradamente conocido, como consecuencia del estudio de la esterilidad existente en las situaciones de hiperprolactinemia. En células granulosa en cultivo, la PRL impide la inducción de aromatasas producida por la FSH (Dorrington et al, 1982), y tiene efectos contradictorios sobre la producción de progesterona, que incluyen inhibición o estímulo de uno de los enzimas reguladores de su síntesis, la 3 β -HSD, e inhibición del enzima responsable de su metabolismo, la 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Veldhuis JD et al, 1980; Casper RF, Erickson GF, 1981; Jones PBC, Hsueh AJW, 1981; Wang C, Chan V, 1982).

De los efectos del LHRH como inhibidor de la función ovárica, se tiene asimismo experiencias basadas en su utilización clínica inicial, como agente terapéutico en las esterilidades. En la mayoría de los casos, los resultados fueron opuestos a los esperados, y la hipótesis del papel antigonal del LHRH quedó establecida (Hsueh AJW, Jones PBC, 1981; Knecht M et al, 1985).

Experimentalmente, ha podido probarse también, que anticuerpos frente al péptido, administrados durante los dos días previos a la ovulación, aumentan el número de folículos

que ovulan con éxito en la rata (Birbaumer L et al, 1985). La mayoría de los efectos de la FSH, sobre la diferenciación de la célula granulosa, no tiene lugar cuando el LHRH se añade simultáneamente con la hormona, a cultivos primarios de estas células. El LHRH, impide la expresión de receptores, deprime la síntesis de esteroides y, previene las modificaciones morfológicas de la célula (Hsueh AJW et al, 1980; Jones PBC, Hsueh AJW, 1980, Jones PBC, Hsueh AJW, 1981b). Sus efectos sin embargo son divergentes, y dependen del estatus hormonal de la célula y del grado de diferenciación. En células indiferenciadas y en ausencia de FSH, el LHRH manifiesta exactamente los efectos contrarios a los que tienen lugar en la célula diferenciada por la presencia de FSH. (Ekholm C et al, 1982; Hillensjö T et al, 1984; Hsueh AJW et al, 1988).

Las células granulosa no proliferan en cultivo, y la inadecuación de los cultivos primarios, como modelo experimental para el estudio de la proliferación, ha conducido a la búsqueda de modelos alternativos, en los que probar el papel de los distintos agonistas que controlan la proliferación. El más eficaz, lo constituye el aislamiento y cultivo de folículos, en los que ha podido demostrarse incorporación de timidina, aumento en el DNA y el número de células. Los folículos en cultivo, tienen la ventaja adicional de conservar las relaciones espaciales entre las células que podrían ser importantes no sólo en la proliferación sino también en la diferenciación posterior. Además el microambiente constituido por el líquido folicular no se destruye, y por tanto la regulación para y autocrina de la proliferación y diferenciación, no se interrumpe (Keel BA et al, 1991; Chakravorty A et al, 1991; Carrol J et al, 1991).

En estas condiciones se ha demostrado, que la proliferación de la célula granulosa se inicia como *in vivo* bajo los efectos de la FSH, y se mantiene por la acción combinada de la FSH, el estradiol, el EGF, de otros factores de crecimiento como el TGF- α y el IGF-I. En la célula granulosa, y en contradicción con lo que sucede en otros tipos celulares, la FSH, principal protagonista de la diferenciación inicia asimismo la proliferación celular (Gospadorowicz D et al, 1977a, 1977b; Gospadorowicz D, Bialecki H, 1979; Adashi et al, 1985; Roy SK, Greenwald GS, 1991).

A pesar de las limitaciones expresadas, existe en el momento presente una visión de conjunto razonablemente buena, acerca de los factores que regulan la proliferación y diferenciación de las células granulosa, de la importancia relativa de cada uno de ellos, y de la cronología de su participación en el proceso. En general, puede además asumirse, que salvo en el caso de la FSH, y como en la mayoría de las células, los factores reguladores de la proliferación antagonizan la diferenciación.

La mayoría de los factores descritos (solo se exceptúan los estrógenos), actúan a través de receptores localizados en la membrana plasmática de la célula, y la orden generada por la unión hormona-receptor, debe por tanto ser transmitida al interior de esta utilizando sistemas de señalización intracelular, cuya activación depende de la interacción del ligando con su receptor.

Los sistemas de mensajeros intracelulares, implicados en los procesos de proliferación y diferenciación celular en general, son conocidos solo parcialmente, y su estudio constituye posiblemente una de las áreas de mayor interés y actividad en biología celular, en el momento presente. Por tanto es necesariamente limitado el conocimiento de los mecanismos de señalización intracelular que participan en la proliferación y diferenciación de la célula granulosa.

Sin embargo, del estudio de los factores que regulan la proliferación y diferenciación de la granulosa, y de los mecanismos intracelulares involucrados en la producción de los efectos biológicos de dichos factores, se obtendrán posiblemente, los conocimientos necesarios para entender el proceso de maduración folicular, la selección del/los folículos que ovularán y en definitiva, para comprender mejor la función del ovario, y en general de la diferenciación y proliferación celular. Parece por ello obvio el interés de la ampliación del nivel actual de dichos conocimientos que se esquematiza en la Fig. 1, y resume en el siguiente apartado.

1.2 La señalización intracelular de la proliferación y diferenciación de la célula granulosa

El receptor de la FSH, la principal molécula reguladora de la diferenciación, se encuentra acoplado a la generación de AMPc. El papel del AMPc como mensajero, se considera probado por las numerosas evidencias experimentales que demuestran su capacidad para producir prácticamente todos los eventos que caracterizan la diferenciación.

El receptor de FSH se encuentra acoplado a adenilato ciclasa (AC), y tras la interacción FSH-R, pueden medirse aumentos en la actividad del enzima (Kolena J, Channing CP, 1972; Hunzicker-Dunn M, Birnbaumer L, 1976), detectables tres horas después del tratamiento con la hormona. Los aumentos en la concentración del AMPc citoplasmático tiene lugar tras un intervalo de tiempo similar (Ratner A, 1976)

La activación de la AC sucede probablemente de forma no diferente de la descrita clásicamente para otros receptores acoplados a AC porque pueden reproducirse los efectos biológicos de la hormona: i) Aplicando toxina de *vibrio cholerae*, que ADP-ribosila, o NaF que activa Gs, ii) Estimulando la subunidad catalítica con forskolin (FK), iii) Utilizando análogos semisintéticos no metabolizables como el (But)₂AMPc o el BrAMPc, iv) Inhibiendo la fosfodiesterasa con metil-isobutil-xantina (MIX). Entre los efectos biológicos de la FSH que pueden ser reproducidos por el AMPc se encuentran, los cambios morfológicos atribuidos a la hormona, la inducción de la síntesis y secreción de esteroides, y la expresión de los diversos receptores que la hormona induce (Knecht M et al, 1981; Nimrod A, 1981; Wang C et al, 1982; Knecht M et al, 1983a y 1983b; Ranta T et al, 1984; Welsh T et al, 1984).

Además, la FSH activa en célula granulosa a la proteína quinasa A (PKA), produciendo la síntesis y fosforilación de un numeroso grupo de proteínas (Darbon JM et al, 1984; Knecht M, 1986).

El receptor de la LH se encuentra asimismo acoplado a AC, y el AMPc aumenta en el interior de las células tras la unión LH-R (Kolena J, Channing CP, 1972; Hunzicker-Dunn M, Birnbaumer L, 1976). Sin embargo, el AMPc sólo está implicado en la señalización intracelular de algunos de los efectos biológicos de la hormona, como la respuesta crónica a la LH, o el mantenimiento de la morfología de la célula luteal, y de los componentes intracelulares necesarios para la síntesis y secreción de progesterona. Otros sistemas de mensajeros intracelulares como el del Ca^{2+} -Calmodulina (Veldhuis JD, Klase PA, 1982; Carnegie JA, Tsang BK, 1984; Veldhuis JD et al, 1984; Asem EK et al, 1987) y el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2)-diacilglicerol (DAG)-proteína quinasa C (PKC) (Davis JS et al, 1984), podrían asimismo participar en la transducción de las órdenes de la hormona al interior de la célula.

No se conocen los mensajeros intracelulares del EGF en célula granulosa ovárica, sin embargo podría suponerse por extrapolación de lo que ocurre con los receptores del péptidos en otras células, que la activación de la tirosina quinasa asociada al receptor(...), constituye el primero de una serie de eventos que varían dependiendo de la célula que transmitirían la señal al interior de esta.

El receptor de Prolactina (PRL), pertenece a la superfamilia de las citoquinas. El receptor de uno de los miembros de esta familia, la Interleukina II (IL-II), está acoplado a una hipotética fosfolipasa C (PLC) específica de glicosil fosfatidilinositol (GPI) (Eardley DD et al, 1991). Tras la unión de la PRL a su receptor en célula granulosa, ha podido demostrarse asimismo hidrólisis de GPI, generación de diacilglicerol (DAG), y de la cadena polar formada por un oligosacárido, que purificado de hígado e incorporado a un cultivo de células granulosa reproduce al menos uno de los efectos de la hormona (Fanjul LF et al, 1993).

En cuanto al LHRH, uno de los antagonistas de la diferenciación, inhibe la generación de AMPc (Knecht M, Catt KJ, 1981; Knecht et al, 1981)), y los efectos diferenciadores del nucleótido en célula granulosa ovárica (Knecht M, Catt KJ, 1983). El LHRH inhibe a la

adenilato ciclasa (Knecht M et al, 1983; Ranta T et al, 1983), pero también es capaz de inhibir los efectos de la FSH, actuando en lugar distal a la producción de AMPc, puesto que: i) Previene los efectos de la estimulación máxima de la adenilato ciclasa con la CTX, ii) Inhibe los efectos de la activación de la subunidad catalítica de AC con FK, y iii) Sus efectos persisten en presencia de análogos no metabolizables del AMPc o de MIX (Darbon JM et al, 1984).

El LHRH, tiene en la célula granulosa, un receptor acoplado a PLC específica para fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP₂). Tras la unión del péptido con su receptor, se genera de forma rápida y transitoria inositol 1,4,5 trisfosfato (IP₃), y diacilglicerol (DAG), cuyos niveles citosólicos se mantienen elevados por un espacio de tiempo más prolongado (Naor Z, Yavin E, 1982; Davis JS et al, 1983; Davis et JS al, 1984; Ma F, Leung CK, 1985; Davis JS et al, 1986).

El PMA, o los análogos semisintéticos de DAG, reproducen la mayoría de los efectos del LHRH en célula granulosa, por lo que podría deducirse que, es la activación de proteína quinasa C el mecanismo del que dependen dichos efectos (Welsh TH et al, 1984; Kasson BG et al, 1985; Shinohara O et al, 1985). El (IP₃), induce la liberación de Ca²⁺ de almacenes intracelulares, aunque se desconoce si este es el mecanismo por el que el LHRH inhibe la diferenciación iniciada y mantenida por la FSH.

Para conocer la importancia relativa del Ca²⁺ y del DAG en la transmisión intracelular de la señal del LHRH, se han comparado los efectos biológicos del LHRH sobre células indiferenciadas y previamente diferenciadas con FSH, con aquellos de los agentes que activan PKC o producen aumentos en el Ca²⁺ libre citoplasmático. Se midieron para ello, la activación de 3β-HSD, y la acumulación de progesterona y estradiol, en respuesta a PLC de origen bacteriano que libera DAG de las membranas celulares, al PMA que activa PKC, y a un ionóforo para el Ca²⁺, el A23187, y a dosis depolarizantes de K⁺, que causan una entrada masiva del ion al interior de la célula (Fanjul LF et al, 1992).

Todos los tratamientos que activan PKC, reproducen los efectos del LHRH , al contrario que la movilización de Ca^{2+} , que indujo la actividad de 3β -HSD en células indiferenciadas y potenció los efectos de la FSH en células diferenciadas. Este hecho junto con la existencia de evidencias experimentales previas acerca del papel del Ca^{2+} como inhibidor de la fosfodiesterasa y activador de la esteroidogénesis en células granulosa y luteales (Carnegie Ja, Tsang BK, 1983), sugiere, que únicamente la PKC está implicada en los mecanismos intracelulares por los que el LHRH inhibe la diferenciación de la célula granulosa ovárica.

La acumulación del DAG en el citoplasma de la célula granulosa, se prolonga por un espacio de tiempo considerablemente más largo que aquel en el que tiene lugar la hidrólisis de PIP_2 , y la acumulación de IP_3 , lo que sugiere, que la hidrólisis del fosfolípido, es solo el primero de una cascada de acontecimientos que posibilitarían el mantenimiento de los niveles elevados de DAG en el citoplasma, y una activación más duradera de la proteína quinasa C de la que podría esperarse del DAG generado a partir de PIP_2 .

Poco o nada se conoce, acerca de los sistemas de señalización intracelular implicados en la transmisión de las ordenes de las moléculas reguladoras que controlan la proliferación de la célula granulosa. La ausencia de proliferación celular *in vitro*, a dificultado el conocimiento y la comprensión del proceso. Es por ello, que a pesar de que los mecanismos de señalización intracelular acoplados a las moléculas reguladoras de la proliferación, podrían estar conservados, y ser en consecuencia medidos en los cultivos, no puede en cambio establecerse la correlación entre la activación de dichos mecanismos y su proliferación, requisito imprescindible para demostrar su participación en el proceso.

Los fenómenos biológicos que tienen lugar a largo plazo regulados por la activación continuada de PKC, incluyen el crecimiento y la proliferación celular, el control de canales iónicos y otros cambios, en neuronas relacionadas con la memoria, y las alteraciones en la función del receptor que son la base de la desensitización hormonal. Ocurren en la mayoría de las células y el fenómeno no es por tanto específico de la célula granulosa.

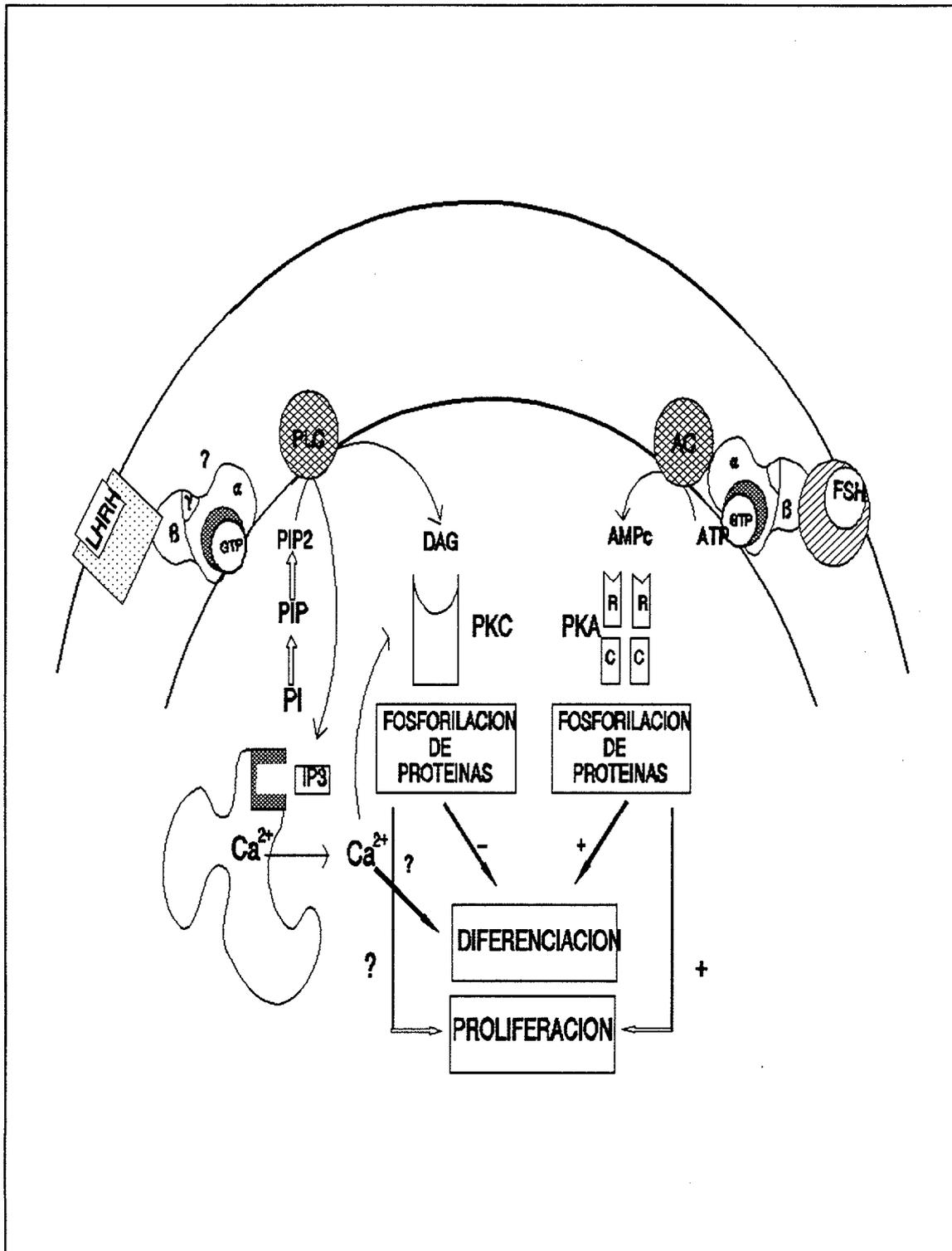


Fig. 1: Esquema de la señalización intracelular de la FSH y el LHRH en célula granulosa ovárica.

Todos ellos precisan de la existencia de una activación prolongada del enzima, activación que no podría obtenerse sólo a través de la hidrólisis de PIP_2 . En los últimos años, se ha investigado la existencia de generación de DAG por agonistas hormonales que activan PKC durante períodos de tiempo prolongados, y regulan así efectos biológicos que tienen lugar a largo plazo.

En un número cada vez mayor de células, entre las que se encuentran los hepatocitos en respuesta a la vasopresina, las células glomerulosa en respuesta a la angiotensina II, o el astrocitoma 131N1 en respuesta a la activación de su receptor muscarínico, las discrepancias entre el tiempo durante el cual IP_3 y DAG se encuentran elevados en el citoplasma celular, la cantidad de DAG acumulado, y el análisis de la especie molecular del DAG liberado, han conducido a pensar, que otro fosfolípido de membrana podría ser el origen a partir del cual los agonistas generan DAG (Billah MM, Anthes JC, 1990; Exton JH, 1990).

Dicho fosfolípido pudiera ser la fosfatidilcolina (PC), que podría ser utilizada por las moléculas reguladoras, durante períodos de tiempo indefinido. La PC es entre 5 y 10 veces más abundante en las membranas celulares que el PIP_2 , su resíntesis a partir de DAG es, como señala Vance, mucho más eficaz, pues requiere un solo paso enzimático frente a los 5 del PIP_2 y precisa de un solo mol de CTP comparado los 1 de CTP y 3 de ATP, necesarios para resintetizar PIP_2 (Pelech SL, Vance DE, 1989).

1.3 El recambio de fosfatidilcolina en la señalización intracelular de respuestas a largo plazo

La fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido más abundante en las membranas, y constituye el 50% del total de los fosfolípidos celulares. El interés por el estudio del ciclo síntesis/catabolismo de la PC, estuvo marcado, hasta la segunda mitad de la pasada década, por los que parecían ser sus papeles más importantes dentro de las células en general: el mantenimiento de la capa bilipídica, o de alguna célula especializada, las células alveolares del pulmón, productoras de surfactante, o el hepatocito, en cuya membrana la PC, participa

en el proceso de internalización de lipoproteínas.

La escasez de una molécula determinada, constituye uno de los criterios que se han manejado siempre como fundamentales, para establecer su papel como precursora de putativos mensajeros intracelulares. Es quizá por ello por lo que la fosfatidilcolina nunca fue considerada como un hipotético candidato a este papel.

Otro de los criterios utilizados desde Sutherland, para definir a un segundo mensajero o sistema de señalización, es la existencia de un ciclo de generación/desaparición relativamente rápido y regulable por la molécula cuya señal ha de transmitir. El poco interés despertado por la fosfatidilcolina hasta muy recientemente no es sin embargo justificable, puesto que ambos criterios pueden ser cumplidos por la PC, como intentaremos discutir.

1.3.1 La síntesis de fosfatidilcolina

La síntesis de fosfatidilcolina, ha sido a pesar de su poco interés bien estudiada, y tiene lugar por dos vías diferentes, que se esquematizan en la Fig. 2 y se describen a continuación:

a) La vía de la CDP-colina, en la que la P-colina es esterificada en la posición 3 del diacilglicerol, formado previamente por acilación 1,2 del glicerol. La esterificación la lleva a cabo un enzima no limitante, la CDP-colina:1,2 diglicerido colinafosfotransferasa. La CDP-colina, se sintetiza en dos pasos sucesivos, la fosforilación de la colina a fosfocolina (P-C) llevada a cabo por la colina quinasa, un enzima idéntico a la etanolamina quinasa, y la transformación de P-colina en CDP colina, llevada a cabo por el enzima limitante de la vía, la CTP: fosfocolina citidiltransferasa [EC 2.7.7.15] (CT).

(b) La síntesis por transmetilación a partir de fosfatidiletanolamina (PE). Tres metiltransferasas diferentes están implicadas en el proceso, transfiriendo grupos metilo de un donador, la s-adenosil metionina.

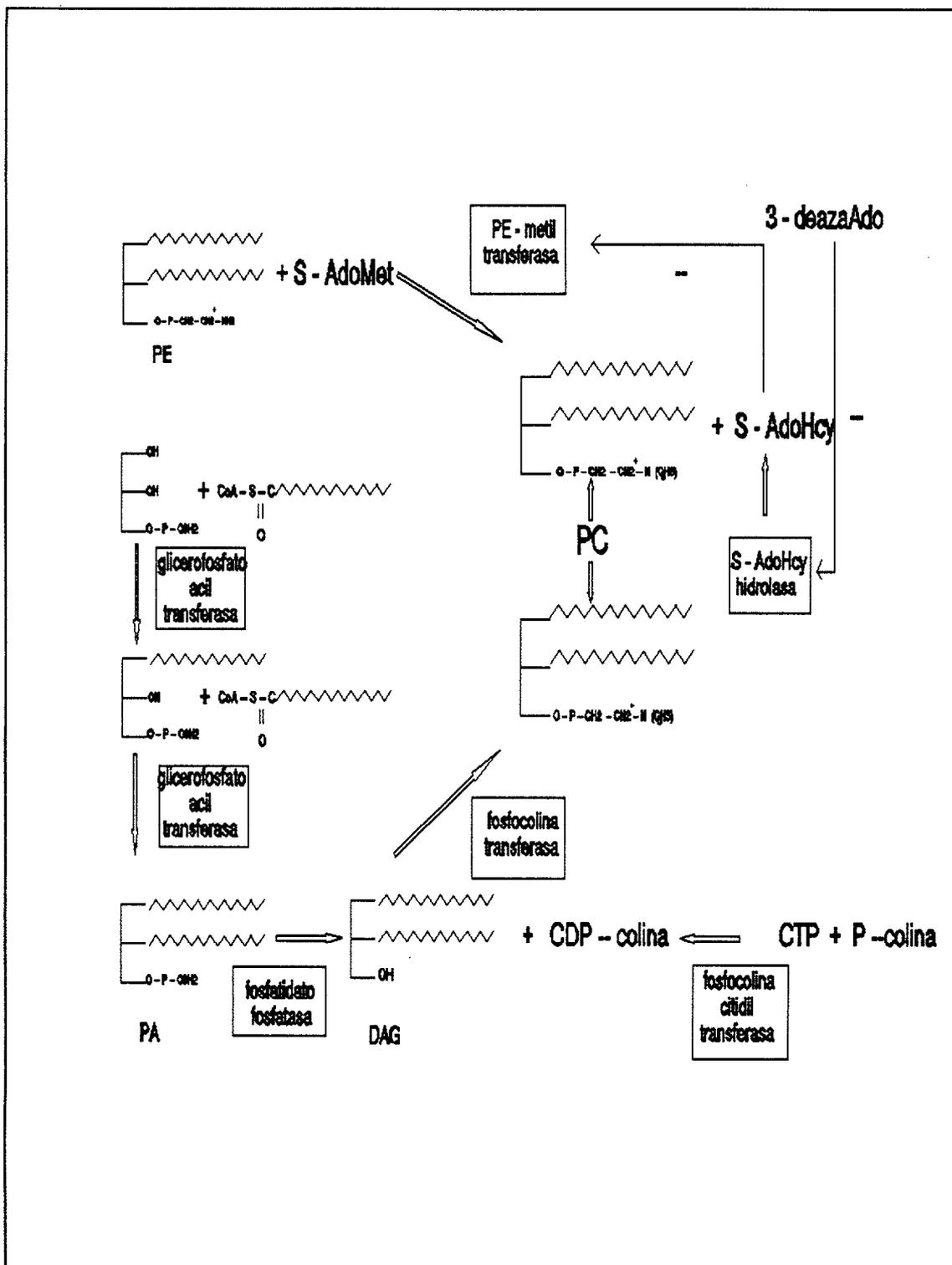


Fig. 2: Esquema de las distintas vías de síntesis de fosfatidilcolina.

La vía de la CDP-colina es absolutamente mayoritaria, y se utiliza para la síntesis *de novo*, o la resíntesis a partir de diacilglicerol y colina o P-colina previamente generados durante el catabolismo, de forma que es posible establecer un ciclo muy similar al que ha sido descrito para otros fosfolípidos (Pelech SL, Vance DE, 1989)

1.3.2 La hidrólisis de fosfatidilcolina

Del examen de la estructura de la fosfatidilcolina, se obtiene sin dificultad la conclusión de su capacidad como precursor de mensajeros intracelulares ya conocidos. Al igual que los fosfoinositósidos, la existencia de una fosfolipasa C (PLC) específica de PC, podría liberar diacilglicerol (DAG) y P-colina. Una hipotética fosfolipasa D (PLD) podría hidrolizar el lípido a ácido fosfatídico (PA) y colina, y una fosfolipasa A₂ (PLA₂), producir un lisofosfolípido y el ácido graso correspondiente (Fig. 3).

Para que el ciclo de la PC pueda ser considerado un sistema de señalización intracelular, es necesario en primer lugar, establecer la existencia de una hidrólisis secundaria a la interacción de moléculas reguladoras con su receptor, y establecer el carácter de mensajero intracelular de los productos de dicha hidrólisis.

Con el descubrimiento de la existencia de los isoenzimas de la PKC (Hata A et al, 1993; Hug H, Sarre TF, 1993)), y la posibilidad de que el enzima pudiera ser activado por especies de diacilglicerol distintas de las que se generan a partir de PIP₂, se despejó parcialmente el segundo de los requerimientos. Por otra parte, el hecho de que con alguna frecuencia, los efectos de la activación con ésteres de forbol de la PKC, no fueran idénticos a la administración de diacilglicerol, abrió la puerta a la posibilidad de que el DAG pudiera ser un mensajero con efectos que trascienden los de su capacidad para activar PKC.

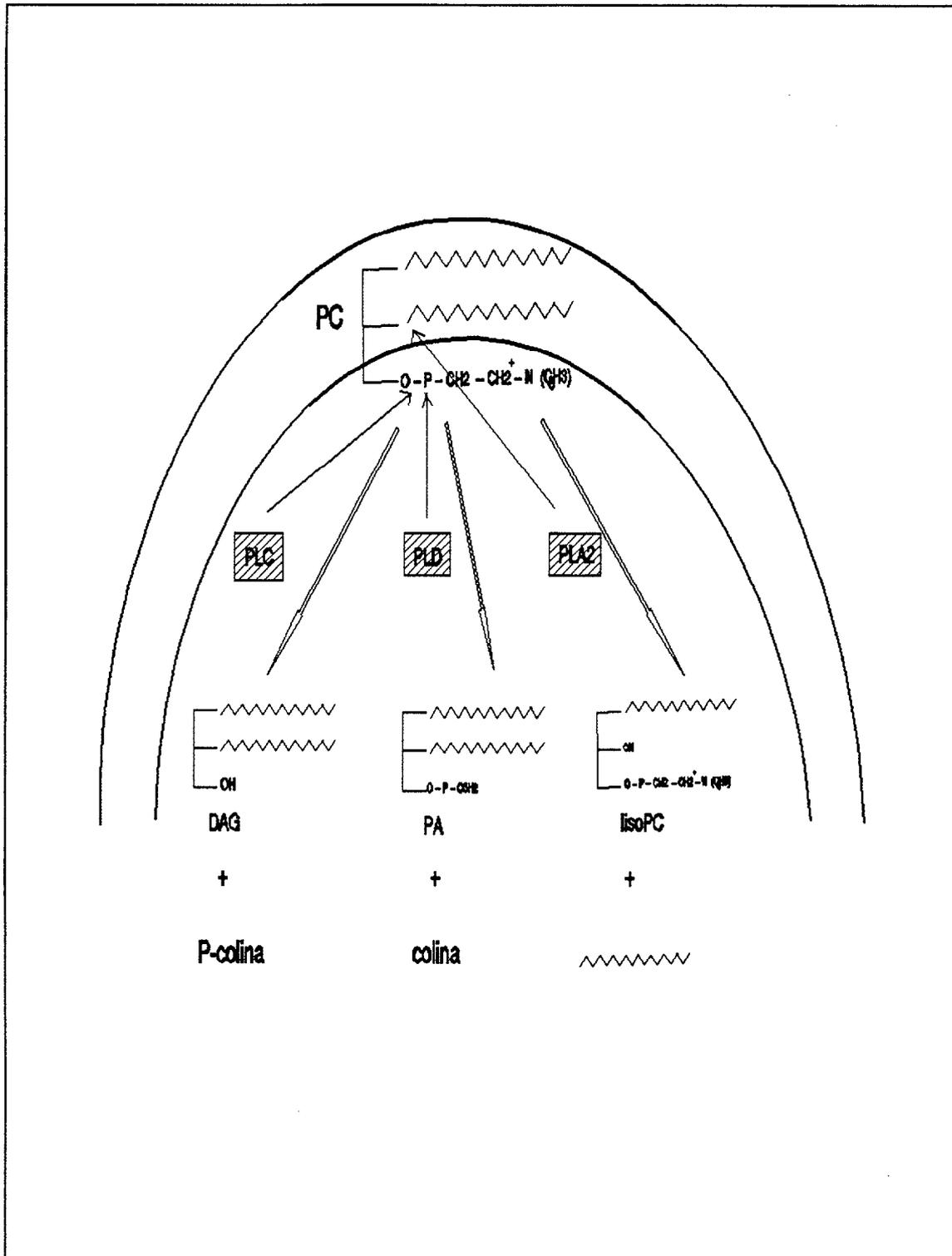


Fig. 3: Esquema de las distintas vías de metabolización de la fosfatidilcolina.

El papel del PA como mensajero intracelular, no está absolutamente probado, pero existen numerosas evidencias experimentales que lo sugieren. Existen hipótesis acerca de su papel como ionóforo, o como sustrato de la PLA₂. Lo mismo podría afirmarse de los lisofosfolípidos, y de la capacidad de las células para transformar en moléculas activas en la señalización a los ácidos grasos liberados tras la acción de la PLA₂. Entre los productos del metabolismo por lipo y ciclooxigenasas del ácido araquidónico se encuentran, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, todas ellas moléculas activas en la regulación intracelular. Finalmente Colina y P-colina podrían por algún mecanismo aún no desvelado actuar como transmisores de señales.

Las primeras evidencias acerca de la hidrólisis activa de PC, se obtuvieron en 1981 (Mufson RA et al, 1981), tras la demostración de que los ésteres de forbol liberaban P-colina en fibroblastos de ratón. Resultados parecidos fueron obtenidos más tarde con otras células (Guy GR, Murray AW, 1982; Besterman JM et al, 1986; Daniel LW et al, 1986; Liscovitch M et al, 1987; Muir JG, Murray AW, 1987; Scherey MP et al, 1987; Takuwa N, 1987; Cabot MC et al, 1988).

En 1985, se demostró por primera vez que angiotensina II, epinefrina y vasopresina, en hepatocitos, inducían la liberación de DAG a tiempos diferentes y de distintas especie molecular de los esperados para la hidrólisis de PIP₂ (Bocckino SB et al, 1985; Augert G et al, 1989), y se estableció la hipótesis de que la fosfatidilcolina estaba siendo hidrolizada en respuesta a la activación de PKC por el DAG que dichas hormonas generaban al romper PIP₂.

La hidrólisis por PLC con producción de DAG y P-colina ha sido posteriormente demostrada en células doblemente marcadas con un ácido graso y colina, en linfocitos T en respuesta a la interleukina I (Rossoff PM et al, 1988), páncreas en respuesta a la bombesina, carbacol y colecistokinina (Peter-Riesch B et al, 1988; Matokazi T, Williams JA, 1989; Wolf BA et al, 1989; Dunlop M, 1989), BC3H-1 miocitos en respuesta a la insulina (Farese RV et al, 1988; Nair GP et al, 1988), células musculares aórticas A-10 en respuesta a la

vasopresina (Grillone LR et al, 1988), músculo liso vascular en respuesta a la angiotensina (Griendling KK, 1986), músculo cardíaco en respuesta al carbacol (Loffelholz K, 1989), 1321N1 astrocitoma en respuesta al carbacol (Martinson EA et al, 1989), células epiteliales MDCK-DI en respuesta a α -adrenérgicos (Slivka SR et al, 1988), fibroblastos 3T3, en respuesta al PDGF y la bombesina (Price BD et al, 1989; Muir JG, Murray AW, 1987), y fibroblastos REF52 en respuesta a la vasopresina y factores del suero (Welsh CJ et al, 1988).

Las evidencias acerca de la existencia de una generación bifásica de DAG se han acumulado durante los últimos 5 años (Lassègue B et al, 1993; Pettit TR, Wakelam MJO, 1993; Tuominen RK, 1993), y también el concepto de que en algunos casos el DAG pudiera no provenir de una hidrólisis directa de la fosfatidilcolina por parte de la PLC.

La hidrólisis por una PLD de la fosfatidilcolina y la transformación del PA liberado en diacilglicerol por la PA fosfohidrolasa, ha emergido como un mecanismo alternativo para generar DAG de fosfatidilcolina (Billah MM, 1991). Así sucedería en un gran número de células en las que en respuesta a diversos agonistas, se obtendría una acumulación de PA y colina.

Este es el caso de los neutrófilos, en respuesta a la fracción 5a del complemento, el PMA, el ionóforo A21187 ó la esfingosina (Cockcroft S, 1984; Agwu DE et al, 1989; Billah MM et al, 1989; Mullman TJ, 1990a, 1990b; Reinhold SL et al, 1990; Thompson NT, 1990; Mullman TJ, 1991), las células HL-60, en respuesta a fMLP, A23187, el análogo permeable del DAG, octanoil acetyl glicerol (OAG) y el PMA (Pai J-K et al, 1988; Billah MM et al, 1989), los eosinófilos en respuesta a la activación con la fracción 5a (C5a) del complemento, el PMA y el A23187 (Minnicozzi M, 1990), las plaquetas en respuesta a la trombina (Rubin R, 1988; Randall RW et al, 1990), el páncreas en respuesta a la estimulación con carbacol y bombesina (Peter-Riesch B, et al, 1988; Matozaki T, Williams JA, 1989; Dunlop M, Metz SA, 1989), líneas celulares derivadas de tejido nervioso como el neuroblastoma NG108-15 o el astrocitoma 1321N1, cuando son estimuladas por el carbacol, la esfingosina, el PMA ó el análogo permeable del DAG, dioctanoil glicerol (DiC8) (Liscovitch M et al, 1987,

Liscovitch M, 1989; Lavie Y, Liskovitch M, 1990).

El mismo comportamiento presentan el músculo cardíaco en respuesta al carbacol (Lindmar R et al, 1988), el endotelio vascular cuando es estimulado por la trombina, la bradiquinina, el A23187 o el PMA (Martin TW, Michaelis KM, 1988, 1989; Martin TW et al, 1990), los hepatocitos tras aplicar vasopresina, angiotensina o adrenalina (Bocckino SP et al, 1987a, 1987b), los fibroblastos NIH3T3 y REF52 cuando son estimulados con EGF o vasopresina (Cabot MC et al, 1988a, 1988b, 1989; Welsh CJ et al, 1988), e incluso algunas células esteroideogénicas, como la célula glomerulosa de la corteza adrenal (Bollag WP et al, 1990) y la propia célula granulosa (Liscovitch M, Amsterdam A, 1989).

Parece por tanto probado, que en la mayoría de los casos en los que se observa una acumulación bifásica y/o prolongada de DAG en la célula tras el estímulo con un agonista, el precursor no es otro que la fosfatidilcolina. Es obvio en el momento presente, que la fosfatidilcolina puede ser considerada una fuente importante de al menos dos moléculas, el ácido fosfatídico y el diacilglicerol, con importantes papeles en la transducción de señales, durante la regulación de las funciones diferenciadas de las células.

Es además posible que variaciones en el recambio o contenido de PC, participen asimismo en la señalización intracelular y/o sean fenómenos asociados con la proliferación. Las evidencias más importantes que ligan la generación de DAG a partir de fosfatidilcolina con la proliferación celular, han sido obtenidas en células transfectadas con el oncogen *ras*, o microinyectadas con su producto, la p21^{ras}, en las cuales se producen aumentos mantenidos en los niveles de DAG, efecto que puede ser mimetizado con la activación de proteína quinasa C (Lacal JC et al, 1987a, 1987b; Wolfman A, Macara IG, 1987).

La transformación de fibroblastos con *ras* induce un aumento documentado por varios grupos en el recambio de fosfatidilcolina, que se traduce en aumentos citoplasmáticos de DAG y en algunos casos de P-colina. En NIH3T3, la generación de DAG a partir de PC, induce una activación de la PKC diferente de la producida por el DAG liberado de PIP₂.

Asimismo la microinyección de p21^{ras} en oocitos de *Xenopus laevis*, parece correlacionarse con la aparición de hidrólisis de PC y la generación de DAG. La maduración del oocito puede activarse con microinyección de PLC específica de PC y prevenirse por el contrario, si se inyecta anticuerpo anti PLC (Díaz-Laviada I et al, 1990, 1991; Lopez-Barahona M, et al, 1990; García de Herreros A et al, 1991).

Los cambios en el ciclo de la fosfatidilcolina, asociados con los procesos proliferativos, que afectan a la síntesis de PC, están también documentados (Teegarden D et al, 1990). Sin embargo, la incognita de si los aumentos en la síntesis son una consecuencia del recambio acelerado por la hidrólisis previa, reflejan una síntesis *de novo*, ó ambos procesos ocurriendo simultáneamente, no ha sido aún resuelta.

La respuesta a la cuestión acerca del grado de implicación del ciclo de la PC en la regulación de la proliferación celular, precisa probablemente del estudio experimental cuidadoso de las relaciones entre síntesis/degradación de PC y la proliferación, utilizando no sólo líneas celulares inmortalizadas, sino células normales en las que los procesos proliferativos sean relevantes para su función específica. En cualquier caso, la relevancia del estudio del ciclo de la PC ha trascendido en mucho a aquella que por su papel en la regulación de las funciones celulares que le fué atribuido originalmente.

OBJETIVOS

Los efectos de las moléculas reguladoras, que bloquean la diferenciación de la célula granulosa, constituyen la base de producción de la atresia folicular fisiológica y probablemente también de la patología ovárica asociada con la atresia. Los objetivos a largo plazo de esta Tesis Doctoral son por ello, el estudio de los mensajeros intracelulares implicados en la transducción de los efectos biológicos del LHRH, el factor que parece tener mayor protagonismo activo en el proceso de desdiferenciación de la célula granulosa, y la atresia folicular que este conlleva.

Por otra parte, dada la versatilidad de la célula granulosa para adquirir la capacidad de sintetizar y secretar moléculas muy diversas y para expresar receptores a un variado número de moléculas reguladoras. Y, la complejidad de los mecanismos intracelulares y de las interacciones entre los diversos sistemas de mensajeros, que participan en su proliferación y diferenciación, la célula granulosa, es un modelo particularmente atractivo, para el estudio de los diversos sistemas de señalización implicados en la proliferación y diferenciación celular como procesos generales.

La proliferación es un proceso antagonista del de la diferenciación celular. Se acepta en general como axioma, que en la mayoría de las células normales o tumorales, la diferenciación terminal, concluye el proceso proliferativo, y que la proliferación es más intensa cuando el grado de desdiferenciación celular es mayor. En célula granulosa ovárica, al igual que en otras células puede asumirse por tanto que los factores que inducen desdiferenciación, o frenan la diferenciación, son funcionalmente equivalentes a aquellos que inducen la proliferación de la célula.

Durante los últimos años, se han obtenido evidencias experimentales, acerca de la participación del recambio de fosfatidilcolina, en la señalización de los procesos proliferativos celulares. El sistema de señales intracelulares del LHRH debería ser muy similar al de aquellas moléculas reguladoras de la proliferación y diferenciación, que utilizan el ciclo de la PC como mecanismo de señalización.

Objetivos

Los conocimientos disponibles acerca de dicho sistema de señalización, así lo confirman. La hidrólisis de PIP_2 -generación de DAG, es como ya se ha discutido, el proceso más temprano asociado con los cambios en el ciclo de la PC en la mayoría de las células. La generación de DAG a partir de PC, podría ser también para el LHRH, el siguiente paso, tras la hidrólisis de PIP_2 , en la cascada de señales intracelulares.

El objetivo general y principal de este proyecto, es estudiar la síntesis e hidrólisis de fosfatidilcolina en células granulosa de rata y humanas, su regulación por la FSH y el LHRH, y contribuir al mismo tiempo a probar el papel del recambio de fosfatidilcolina, en la señalización intracelular de la diferenciación y proliferación.

Para cumplir esta meta general, se han marcado los siguientes objetivos concretos:

- 1.- Probar si la FSH produce cambios en células en cultivo en la síntesis y/o hidrólisis de fosfatidilcolina, y el mecanismo, dependiente o independiente de AMPc, por el que dichos cambios ocurren.
- 2.- Probar si el origen del DAG que se genera a tiempos largos en la célula granulosa en respuesta a LHRH, es la fosfatidilcolina, el mecanismo por el que la generación tiene lugar, y la existencia de otros efectos del LHRH sobre el ciclo de la PC.

MATERIAL Y METODOS

3.1 Productos utilizados

3.1.1 Precursores radioactivos

Los productos [^3H -metilcolina] $L\alpha$ -Dipalmitoil fosfatidilcolina (40 Ci/mmol); [^{14}C -metil] cloruro de colina (53 Ci/mmol); [^3H -metil] cloruro de colina (85.1 Ci/mmol); [^{14}C -metil] fosforilcolina (50 Ci/mmol); [^{14}C -metil] citidildifosfocolina (55.5 Ci/mmol); [^{14}C -1,2-cloruro] etanolamina (3 Ci/mmol); [^{14}C -1-araquidonil] $L\alpha$ -1-palmitoil, 2-araquidonil fosfatidiletanolamina (53 mCi/mmol); [^{14}C -1-palmitoil] lisopalmitoil fosfatidilcolina (54 mCi/mmol); [^3H -9,10(N)] oleico (8 Ci/mmol) y [γ - ^{32}P]-ATP (3000 Ci/mmol), se obtuvieron de Du Pont-New England Nuclear (Bad Homburg, Alemania).

3.1.2 Tratamientos y hormonas

La FSH porcina (75 U NIH-S1), se compró a Calbiochem. La hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH) y el ácido okadaico (OK) se obtuvieron de Boehringer Mannheim, (Mannheim, Alemania). El dietilestilbestrol (DES), dioctanoil glicerol (DiC_8), y el éster de forbol (PMA) fueron de Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA).

3.1.3 Productos y material para los cultivos celulares

Los medios de cultivo McCoy's 5a (modificado, sin suero) y Waymouth BM752/1, el suero de caballo, HEPES, L-glutamina, Tripsina y antibióticos utilizados en los cultivos se obtuvieron de Gibco (Grand Island, NY, USA). Las placas de cultivo (35x10 mm), los tubos de cultivo (12x75 mm), las botellas de 25 y 75 cm^2 y las placas de cultivo de 24 pocillos, estériles, fueron de Falcon, Becton y Dickinson, (Lincoln Park, NJ, USA) o Costar, (Cambridge, MA, USA), al igual que el resto del material estéril utilizado. Los filtros de 0.2 μm se obtuvieron de Millipore Ibérica SA, (Madrid, España).

3.1.4 *Productos y material para extracción y cromatografía*

El agua, fue desionizada y bidestilada (Milli-Q, Water Purification System, Millipore Ibérica SA, Madrid, España), todos los solventes se compraron a BDH (Poole, Dorset, Inglaterra), y fueron de la mejor calidad posible (Analar* o Aristar*).

Las placas para cromatografía en capa fina de silicagel 60, con soporte de cristal (20 x 20 cm y 0.25 mm de espesor) se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania) y los patrones de lípidos se compraron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

3.1.5 *Material y productos de autorradiografía*

Las placas de autorradiografía, Kodak X-OMAT AR2 suministradas por Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA) y el intensificador fue Enlightning de Du Pont-New England Nuclear (Bad Homburg, Alemania).

3.1.6 *Otros productos*

El ATP, ácido etilendiaminotetracético sal disódica (EDTA- Na_2), ácido etilenglicol-bis-[b-amino etil eter] N,N,N',N'-tetra-acético (EGTA), dimetilsulfóxido (DMSO) y Tritón X-100, así como la dioleína, fluoro-fenil-metil-sulfonato (PMSF), fosfatidilserina (PS), histona III-S, leupeptina, seroalbúmina bovina (BSA), y todos los reactivos generales utilizados en la preparación de tampones se compraron a Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA), BDH (Poole, Dorset, England) o Fluka (Buchs, Switzerland)

El DEAE Sephacel, líquido (Optiscint "Hisafe") y viales de centelleo se adquirieron de Pharmacia LKB (Uppsala, Suecia).

3.2 Obtención, cultivo y marcaje de células granulosa y MA-10

3.2.1 *Animales utilizados*

Para los cultivos de células, se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley paridas en el animalario de la Facultad de Ciencias Médicas y de La Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por 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 ± 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 subcutáneo (1 mg/60 μ l) día en solución oleosa s.c.) para inducir la proliferación de una población homogénea de células granulosa.

3.2.2 *Obtención y cultivo de células granulosa*

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. Durante el sacrificio y extracción de los ovarios no se emplearon 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. Bajo una lupa binocular se separó el parénquima ovárico de la cubierta grasa periovárica y de los restos de trompa unidos al hilio. Las células se obtuvieron por punción cuidadosa de los folículos con agujas de insulina estériles (27x 1/2"). De esta forma, las células contenidas en los folículos fluyeron por expresión al medio de cultivo. Las células terminaron de disociarse por aspiración repetida del medio con pipetas plásticas estériles, de calibre decreciente.

Las células se lavaron y centrifugaron (4 °C, 1.500g x 5 min) cuatro veces resuspendiéndolas en 20 ml de medio fresco. El agregado de células de la última

Material y Métodos

centrifugación se resuspendió en un volumen pequeño (2.5-5 ml) de medio para realizar la evaluación del número de células existente y su viabilidad por el método del azul de tripan.

El número de células totales y el número de células viables (que excluyen el colorante), se determinó usando una cámara de conteo de Neubauer. La viabilidad celular en todos los experimentos fue mayor o igual al 80% y el número de células viables obtenidas por cada ovario osciló (10^6 - 2×10^6) según los experimentos.

Las células granulosa se cultivaron en placas estériles Falcon (35x10 mm) o en placas estériles de 24 pocillos, a una densidad de $\sim 8 \times 10^5$ células viables/placa en 1 ml de medio McCoy's 5a modificado y se mantuvieron bajo atmósfera húmeda en un incubador Heraeus a 37 °C y una pCO₂ del 5% constante durante el experimento (Fanjul LF et al, 1983).

3.2.3 Procedencia y cultivo de las células MA-10

La línea MA-10, fué obtenida de un tumor transplantable de células de Leydig, desarrollado en ratón (M5480P) e inmortalizada y clonada con pases sucesivos del animal huésped al cultivo *in vitro* (Ascoli M, 1981a). El clon MA-10, retiene la capacidad esteroideogénica, aunque es deficiente en 17 α -hidroxilasa, por lo que el producto de la estimulación con LH/hCG es progesterona.

Tiene además de receptores a otros dos péptidos con capacidad reguladora de la esteroideogénesis en células de Leydig (Kasson BG, Adashi EY, Hsueh AJW, 1986), el EGF y la AVP (Ascoli M, 1981b; Ascoli M, Pignataro OP, Segaloff DL, 1989) y nos fué generosamente cedido por el Dr. M. Ascoli (Iowa State University), en el pase 12.

Las células se cultivaron bajo atmósfera humidificada con CO₂ al 5%, en Waymouth MB752/1, con 20 mM HEPES, 1.12 g/l NaHCO₃, suero de caballo al 15% y 50 μ g/ml de gentamicina, en placas de 24 pocillos Costar a una densidad de $1-1.5 \times 10^6$ células por pocillo.

3.2.3 *Marcaje metabólico de fosfolípidos*

Las células granulosa y MA-10, lavadas y en ausencia de suero, se marcaron con los diferentes precursores radioactivos, hasta alcanzar el equilibrio isotópico. Las cantidades utilizadas fueron respectivamente de $0.1\mu\text{Ci/ml}$ para ^3H -oleato y la ^{14}C -LisoPC y de $1\mu\text{Ci/ml}$ para la ^3H -metil colina y ^{14}C -metil colina. El ^3H -oleato y la ^{14}C -Liso PC se añadieron en una solución con albúmina bovina al 1% para facilitar la incorporación al medio. Posteriormente, los fosfolípidos e intermediarios solubles en agua de la síntesis de fosfatidilcolina, se extrajeron, separaron y cuantificaron. Los tiempos a los que se obtuvo el marcaje a actividad específica constante se esquematizan en la Fig. 4.

3.3 **Extracción, separación y cuantificación de fosfolípidos y metabolitos acuosos**

3.3.1 *Extracción*

Al finalizar el período de incubación, se aspiraron y desecharon los medios, y las células se lavaron dos veces con McCoy's 5a modificado o Waymouth MB752/1, suplementado con 1 mM de colina, ó se reincubaron durante los tiempos y con los tratamientos indicados en las respectivas figuras. Para terminar los experimentos, los medios se aspiraron y se añadió 1 ml de metanol frío para extraer, ó 1 ml de TCA al 10% para precipitar los lípidos. Después de mantener las placas durante 15 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$, y a continuación los medios se transfirieron a tubos de cristal limpios (18 x 120 mm). Las células de cada placa por separado fueron raspadas dos veces con 0.5 ml de MeOH frío e incorporadas al tubo correspondiente.

Los lípidos se extrajeron del metanol, ó metanol/TCA, incubando 1 h a $4\text{ }^\circ\text{C}$ con 2 ml de cloroformo, tras lo cual 2 ml más de cloroformo y 1.5 ml de agua, ó 0.5 ml de HCl 0.1N se añadieron a cada tubo, y tras agitación vigorosa fueron centrifugados durante 10 min a 2.000 rpm en una Beckman GPR.

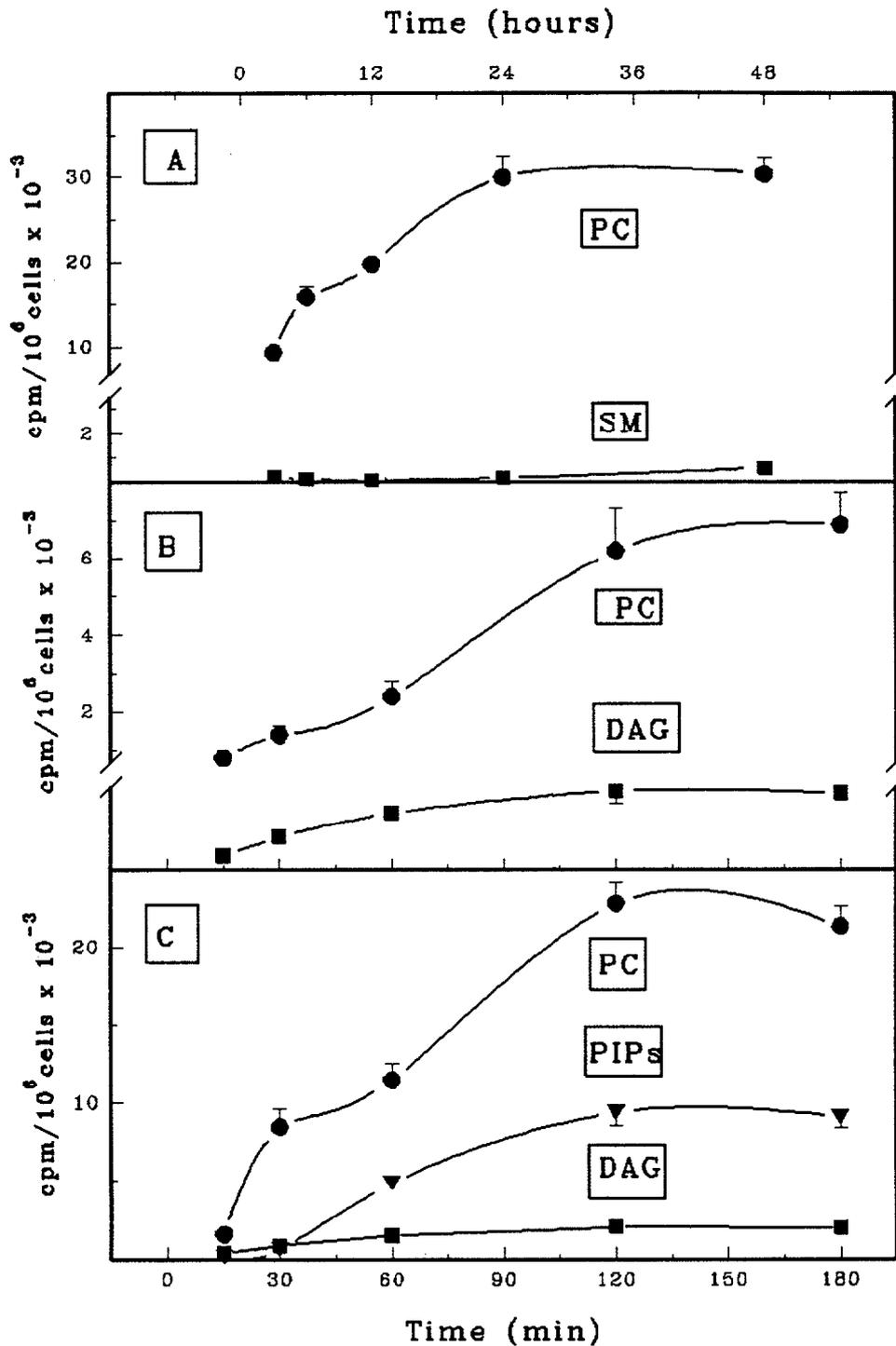


Fig. 4: Marcaje de fosfolípidos en células granulosa.

En A, las células (10⁶/placa), se incubaron con 1 μ Ci/ml de ¹⁴C-colina de 3 a 48 h; en B, las células (10⁶/placa) se incubaron con 0.1 μ Ci/ml de ¹⁴C-lisoPC, y en C, con 0.1 μ Ci/ml de ³H-oleico, tras lo cual los lípidos se extrajeron, cromatografiaron y la radioactividad asociada se midió y expresó en cpm \pm SE de la media.

La fase acuosa obtenida por tras la centrifugación, fué aspirada cuando el marcaje se realizó con ^3H -oleico ó ^{14}C liso-PC, o transferida a tubos limpios y evaporada a vacío para separar los metabolitos acuosos, si el marcaje se realizó con ^{14}C -metil colina. La fase orgánica se lavó una vez más con KCl 0.1M, y tras aspirar la fase superior, la inferior, conteniendo los fosfolípidos, se almacenó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta ser cromatografiada, ó se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno.

3.3.2 Separación de lípidos e intermediarios solubles en agua de la síntesis de fosfatidilcolina

Las muestras secas se disolvieron en $100\ \mu\text{l}$ de cloroformo y aplicaron a una placa de cromatografía en capa fina (CCF) de silicagel con soporte de cristal. Para separar la fosfatidilcolina (PC) de los demás glicerofosfolípidos y de la esfingomielina, las placas se desarrollaron con el solvente cloroformo/acetona/metanol/ácido acético/agua (50:20:10:10:5), con los patrones adecuados. Para separar el diacilglicerol (DAG) del resto de los lípidos, las placas se desarrollaron durante 15 min con tolueno/eter/etanol/ NH_4 (50:40:2:0.2). Para separar los intermediarios solubles en agua de la síntesis de la PC, las muestras secas por evaporación a vacío, se disolvieron en $50\ \mu\text{l}$ de etanol al 50%, se aplicaron y desarrollaron con metanol/C1Na 0.5%/ NH_4OH (100:100:4). Los Rfs obtenidos con los distintos solventes, se muestran en la Fig. 5.

3.3.3 Cuantificación de los lípidos marcados

En algunos experimentos, y antes de contar la radioactividad asociada a las manchas, las placas con solución de intensificador (Enlighthing). Se secaron enfrentandose despues a placas de autorradiografía (Kodak X-OMAT AR2) en cassettes a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ durante tiempos variables dependiendo de la actividad de las muestras y del experimento. Las autorradiografías se revelaron con un sistema automatizado, tras lo cual se obtuvieron contactos de las mismas, algunos de los cuales se han incluido, junto a las respectivas figuras. Alternativamente, las placas se expusieron en cassettes con cristal de BaFBr:Eu sobre

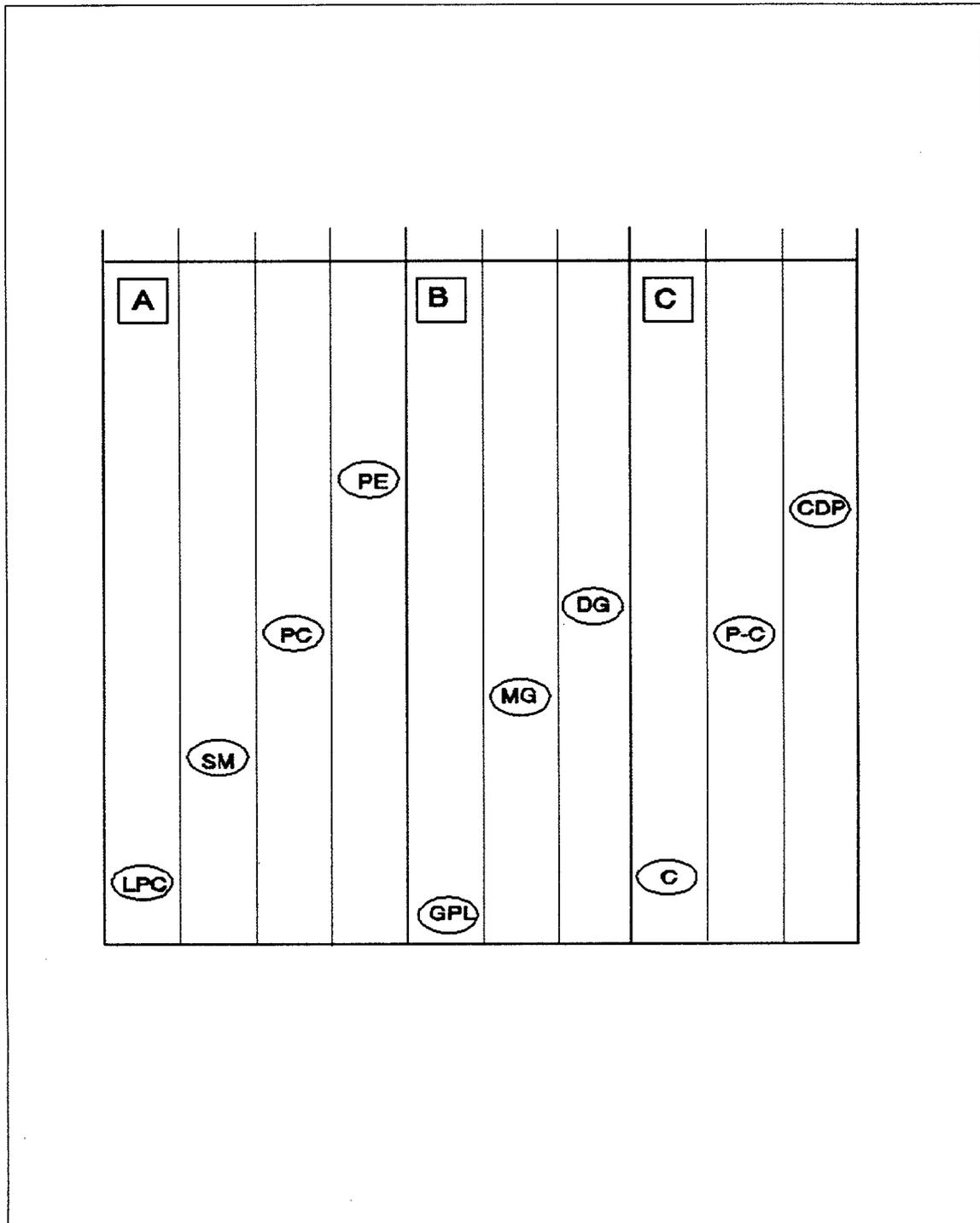


Fig. 5: *RFs de los lípidos y los intermediarios solubles en agua de la síntesis de la PC.*
 En A, cloroformo/acetona/metanol/acético/agua (50:20:10:10:5), $LPC=0.058$, $SM=0.2$, $PC=0.32$, $PE=47$.
 En B, tolueno/eter/etanol/ NH_4OH (50:40:2:0.2), $GPL=0.1$, $MAG=0.4$, $DAG=0.55$.
 En C, metanol/ $ClNa$ 0.5%/ NH_4OH (100:100:4), $C=0.088$, $P-C=0.32$, $CDP=0.5$.

soporte de poliuretano, y fueron analizadas y cuantificadas en un equipo PhosphorImager de Molecular Dynamics (Johnston RF et al., 1990). Una imagen obtenida en videocopiadora se muestra en alguno de los experimentos.

Posteriormente, se rasparon regiones de un cm de alto y se contó la radiactividad que tenía asociada, usando 3 ml de líquido de centelleo (Optiscint "HiSafe" de LKB Wallac), en un contador de centelleo líquido Wallac.

3.3.4 Cuantificación de la masa total de lípidos

Se midió la masa de fosfolípidos totales y PC en función del contenido en fósforo de los mismos, utilizando un método espectrofotométrico (Vaskovsky VE et al., 1975), que mide a 815nm la absorbancia del fósforo cuando reacciona en medio ácido con molibdato sódico para producir un compuesto coloreado, el azul de fosfomolibdeno.

Para ello los lípidos se separaron como se ha descrito, y la fosfatilcolina se extrajo de la sílice con dos lavados sucesivos con metanol seguidos de incubación a 37 °C. Los volúmenes combinados de la extracción se evaporaron por centrifugación a vacío, tras lo cual se digirieron las muestras con 0.2 ml de ácido perclórico al 72% durante 20 min a 180 °C para producir liberación del fósforo unido a la molécula del fosfolípido.

La reacción del fósforo con el molibdato se llevó a cabo en 0.45 ml de sulfúrico 1N, y HCl 4N, conteniendo cloruro de hidrazinio y molibdato sódico al 0.4 y 10% respectivamente.

La absorbancia se midió a 815 nm frente a un blanco, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A. Muestras de fosfatidilcolina a concentraciones de 3.125 hasta 100 nM, se trataron en forma idéntica a los problemas y fueron utilizadas para construir una curva patrón como la que se muestra en la Fig. 6.

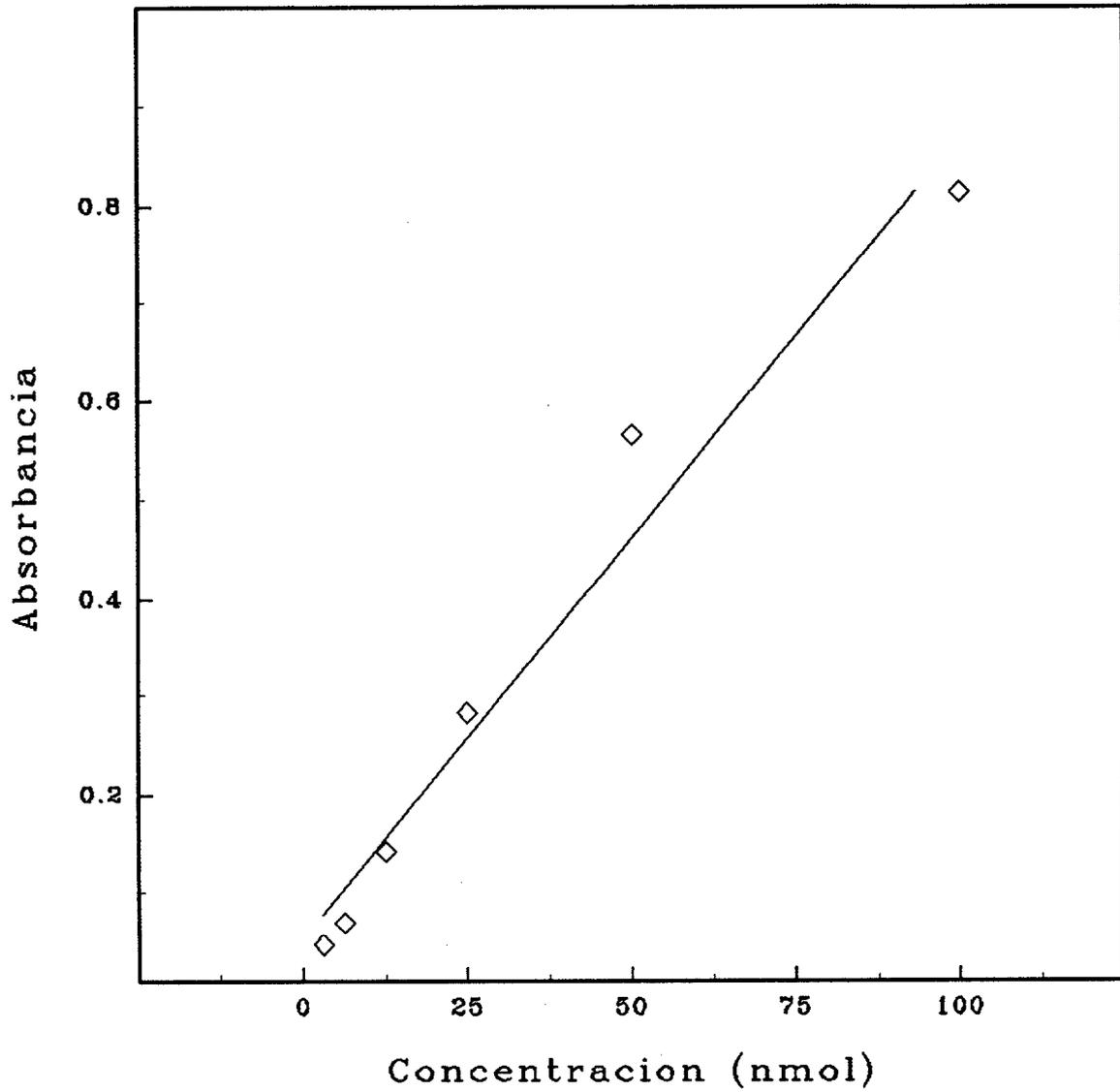


Fig. 6: Curva de calibrado de fosfatidilcolina. Mide la absorbancia de la fosfatidilcolina en un rango que incluye desde 3.125 hasta 100 nM.

3.4 Determinación de proteína quinasa C

Se determinó la actividad de la proteína quinasa C (PKC, en citoplasma y membranas de células granulosa, midiendo la incorporación de ^{32}P desde $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a Histona III-S que actúa como aceptor de fosfato en presencia de Ca^{2+} , fosfatidilserina (PS) y dioleína.

3.4.1 Preparación de las muestras

Tras realizar los tratamientos,, los experimentos se terminaron con 1 ml de tampon Tris HCl frío (20 mM, sucrosa 0.25 M, EGTA 1.2 mM, EDTA 50 mM, pH 7.5). Las placas se rasparon con 1 ml del mismo tampon con 10 mM PMSF,, se centrifugaron, y el precipitado fué resuspendido en tampón, y sonicado a una amplitud de 50 watios durante 20 seg, en un Labsonic 2000.

El sobrenadante de centrifugar el sonicado a 100,000 g y 4 °C durante 20 min, en una ultracentrífuga Beckman Acta III, se consideró como citosol, una alícuota se utilizó para determinar proteínas utilizando el método de Bradford (Bradford M, 1987), y el resto fué congelado a -70 °C hasta el momento del ensayo.

El precipitado se resuspendió en Tris HCl (20 mM, sucrosa 0.25 mM, EGTA 5 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 1%, pH 7.5) conteniendo 10 mM PMSF, se sonicó en las condiciones ya descritas, y se mantuvo durante 30 min en frío para permitir la solubilización de las membranas. A continuación se realizó una nueva centrifugación a 100,000 g x 20 min, el sobrenadante de la cual fué considerado la fracción de membranas.

Para ensayar la actividad del enzima, se realizó una purificación parcial del mismo, aplicando cantidades idénticas de proteína ($\approx 500\mu\text{g}$ en 0.5 ml) a columnas de DEAE-Sephacel (1x13 cm), previamente equilibradas con 10 volúmenes de Tris HCl(20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM, pH 5). El enzima se eluyó con cuatro pulsos de NaCl (0, 0.05, 0.15 y 0.5 M). El 80% de la actividad apareció así a 0.15 M de NaCl.

3.4.2 Ensayo de la actividad del enzima

Reactivos y soluciones stock mse prepararon y conservaron en plástico, y la reacción se llevó a cabo también en tubos del mismo material, durante 3 min a 30 °C, en un volumen final de 250 μ l, con 20 μ l de TRis HCl 20 mM, 50 μ l de acetato magnésico 25 mM, 10 μ l de histona H III-S 0.5%, 50 μ l de CaCl₂ 2.5 mM, 10 μ l de γ -³²ATP (\approx 500,000 cpm) 0.25 mM, conteniendo 10 μ g de PS y 0.5 μ g de dioleína, y agua hasta completar 170 μ l. La reacción se inició añadiendo 80 μ l de la muestra o un volumen equivalente de agua en los blancos.

La actividad basal de cada muestra se midió en una reacción en ausencia de Ca²⁺ y lípidos. Las reacciones se terminaron con 2 ml de TCA al 25%, y los tubos se mantuvieron en frío durante 30 min, para facilitar la precipitación de las proteínas. El contenido de cada tubo, se volcó sobre filtros de nitrocelulosa (Millipore HAWP 02500-HA-04=, que se lavaron tres veces más con 2 ml de TCA al 10%. La radioactividad retenida en los filtros, correspondiente a la histona fosforilada, se contó con 3 ml de líquido de centelleo (Optiscint HiSafe de Pharmacia), en un contador LKB/1211 Rackbeta.

3.4.3 Cálculo de la actividad del enzima

Se realizó substrayendo las cpm del blanco y la actividad basal, y multiplicando las cpm por la concentración de ATP, y dividiendo por las cpm de [γ ³²P]ATP multiplicadas por los 3 min de la reacción. El resultado se expresa en nmol de ³²P transferidos/min.

3.5 Métodos estadísticos

Las muestras fueron siempre triplicados o cuatriplicados, y los experimentos se repitieron al menos tres veces. La comparación entre las distintas muestras se hizo con la T de Student.

RESULTADOS

4.1 Regulación por FSH de la síntesis de fosfatidilcolina

4.1.1 Efectos sobre la síntesis

Para investigar si los posibles efectos de la hormona responsable de la proliferación y diferenciación de la célula granulosa, y dado que la mayoría de los efectos de la hormona tienen lugar después de espacios de tiempo prolongados, que van desde 24 a 48 horas, se pretrataron las células granulosa con la dosis máxima de FSH (200 ng/ml), equivalentes a 0.002 UI/ml, durante 3, 6, 12, 24 y 48 horas, transcurridas las cuales, las células se lavaron y recibieron un pulso de $1\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -metil colina durante 24 h, cantidad y tiempo suficiente como se ha demostrado en la Fig. 4, para marcar toda la PC de la célula. Extraídos los lípidos, en la Fig. 7 se representa un experimento de entre al menos otros tres, en el que se muestra, que la FSH aumenta la incorporación de ^{14}C -metil colina a PC con sólo 3 horas de tratamiento, alcanzando un máximo a las 48 horas donde la cantidad de PC marcada tiene un aumento significativo del 65% sobre los controles.

El estímulo en la incorporación de PC, tiene lugar aparentemente por una activación de la vía de la CDP-colina, porque cuando se midieron los intermediarios de esta vía de síntesis de PC (Fig. 8), la FSH produjo un aumento de de la CDP-colina durante las primeras 12 horas de tratamiento, lo cual indica una activación del enzima limitante de la vía, la CDP:fosfocolina citidiltransferasa (CT). Con 24 h y más visiblemente aún con 48 h de tratamiento, se produce una contradicción aparente de lo anteriormente afirmado, disminuyendo la acumulación de CDP-colina, y aumentando la de su precursor, la P-colina, lo que refleja una inhibición del enzima. La contradicción es sólo aparente, puesto que está descrito (Exton JH 1990, Jamil H et al 1990), que aumentos en la cantidad de PC en las membranas son capaces de inactivar a la CT. Dicha inactivación tiene lugar por translocación del enzima ligada a membranas al citosol, y ha sido ampliamente documentada (Pelech SL et al 1983, Sleight R, Kent C 1983, Aeberhard EE et al 1986, Cornell R, Vance DE 1987, Chander A, Fisher AB 1988, Tercè F et al 1988).

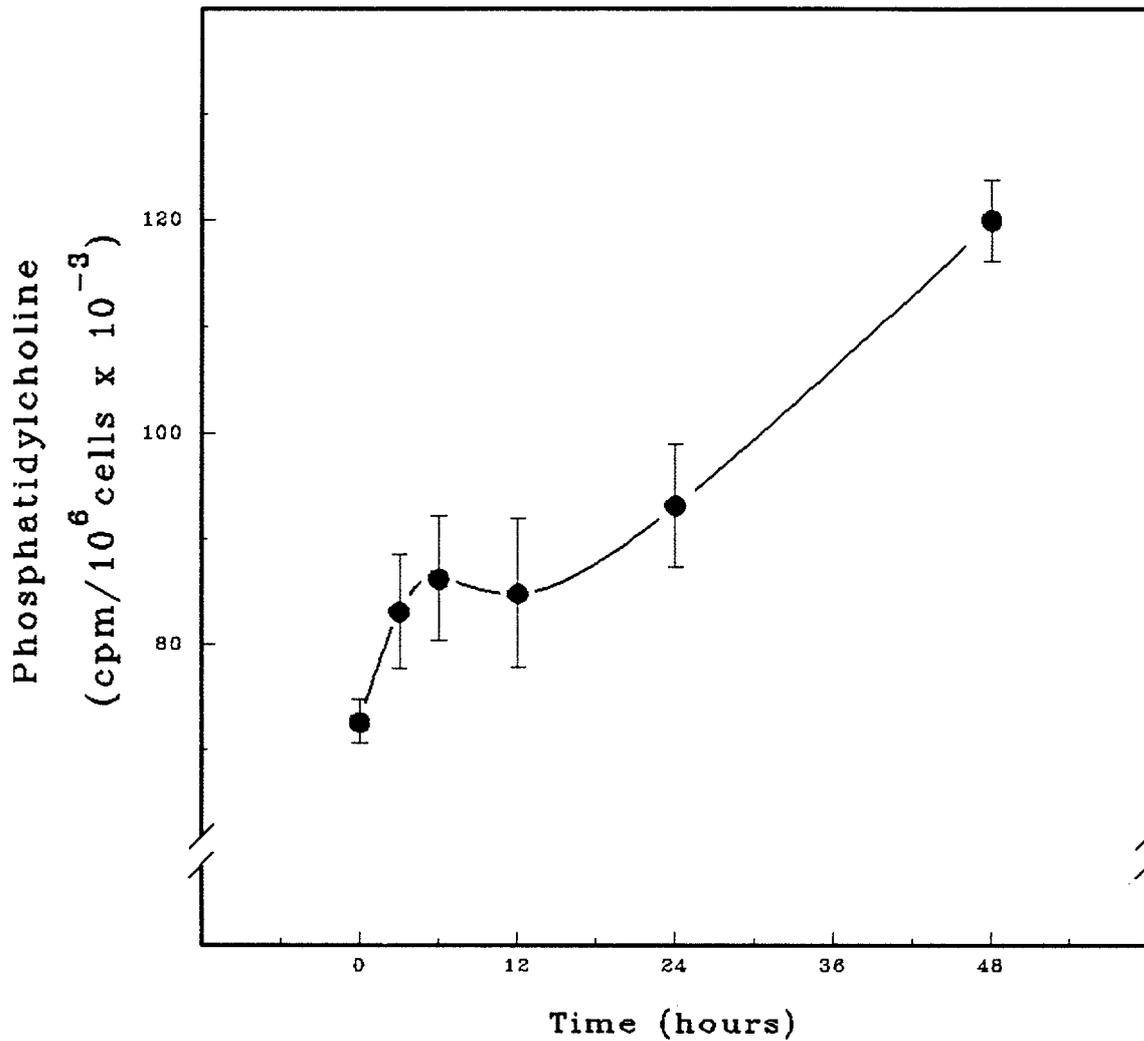


Fig. 7: Efectos de la FSH sobre la síntesis de fosfatidilcolina.

Las células granulosa (10^6 /placa) se trataron con FSH (200 ng/ml) durante los tiempos indicados, y fueron sometidas a un pulso de $1\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -metil colina durante 24 horas. Los fosfolípidos fueron extraídos, y la PC separada y contada como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como la media de las $\text{cpm} \pm \text{SE}$.

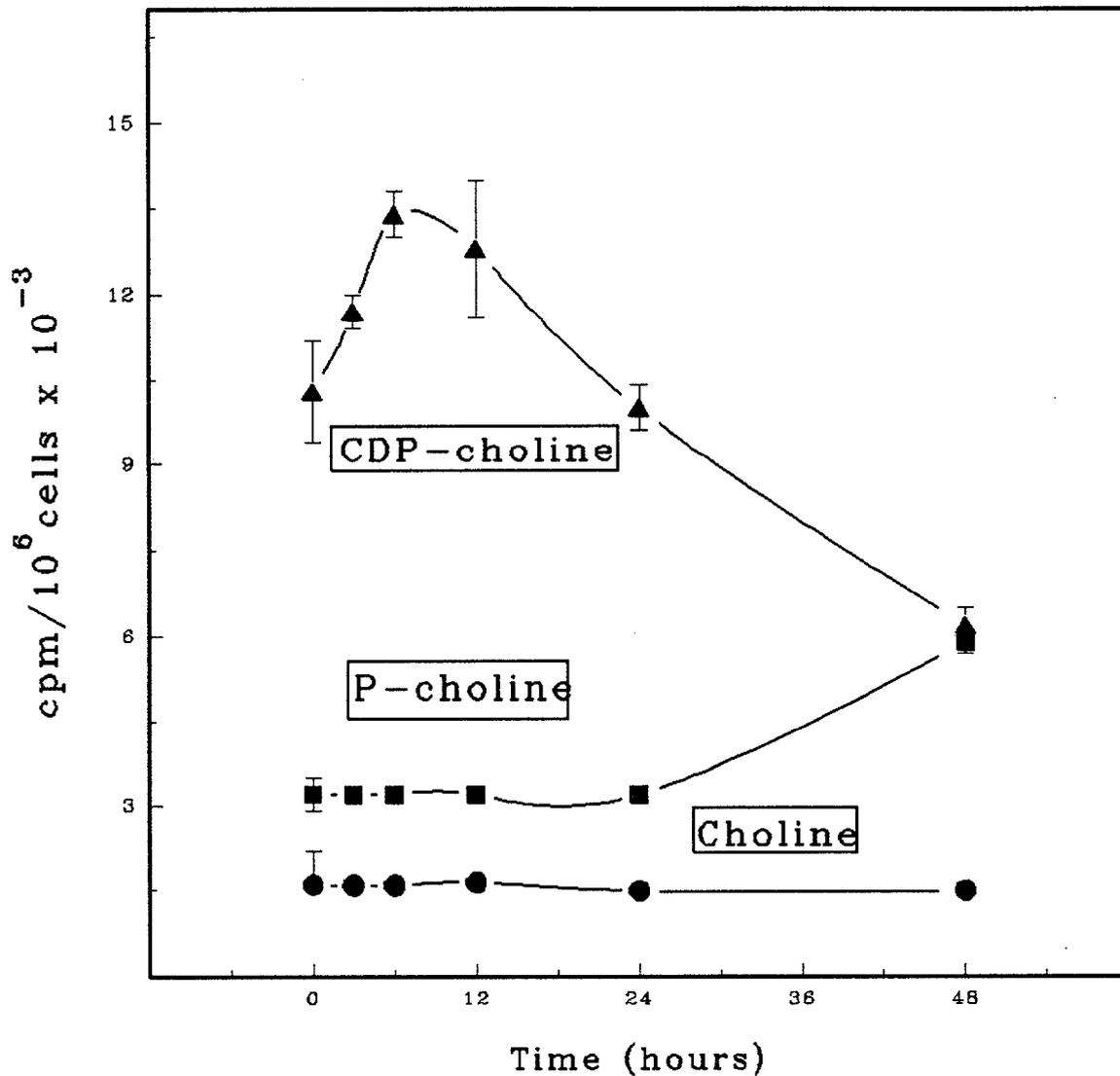


Fig. 8: Efectos de la FSH sobre los intermediarios de la ruta de la CDP-colina. Las células granulosa (10^6 /placa), se pretrataron por lo tiempos indicados con FSH (200 ng/ml), y se incubaron durante 24 h con $1\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -metil colina. Los metabolitos acuosos se extrajeron, cromatografiaron y contaron como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como la media de las $\text{cpm} \pm \text{SE}$.

4.1.2 Mecanismo de activación de la síntesis de PC por FSH

La mayoría de los efectos de la FSH en célula granulosa ovárica, tienen lugar por medio del AMPc, para probar si el aumento en el marcaje de fosfatidilcolina observado, es uno más de estos efectos, las células granulosa (10^6 /placa), se incubaron a tiempos crecientes, desde 3 hasta 48 h, con ^{14}C -metil colina en McCoys' 5a modificado, con 200 ng/ml de FSH ó, 0.3 mg/ml de But₂cAMP, un análogo semisintético no metabolizable del AMPc, que es capaz de mimetizar todos los efectos de la hormona en estas células.

En la Fig. 9, se muestra, que tanto la FSH como el AMPc, son capaces de aumentar significativamente la incorporación de ^{14}C -metil colina a fosfatidilcolina desde las 3 h de tratamiento, alcanzando los cambios aumentos de 300% y el 400% para la FSH y el But₂cAMP respectivamente, a las 48 h. Esto parece probar, que el efecto de la hormona, es también en este caso dependiente de este mensajero intracelular.

La Fig. 10, muestra los resultados, elegidos de entre al menos otros tres experimentos, de cuantificar los intermediarios intracelulares de la ruta de síntesis de la CDP-colina. Al igual que la FSH, el AMPc, aumenta muy rápidamente (a las 3 h), la incorporación de ^{14}C -metil colina a la célula, hecho este que debido al diseño experimental utilizado para obtener los resultados de las Figs. 7 y 8 no había sido puesto de manifiesto. Además, el AMPc activa, confirmando lo anteriormente observado la CT, produciendo aumentos rápidos, desde las 3 h hasta las 12 h en la cantidad de CDP-colina sintetizada a partir de P-colina.

Se reproduce asimismo para la FSH y el But₂cAMP, la inhibición muy patente a las 48 h de tratamiento en la cantidad de CDP-colina acumulada simultanea con aumentos en la acumulación del precursor, la P-colina, que reflejarían la inhibición de la CT, inducida por el aumento en el contenido de PC de las membranas, ya discutida con anterioridad.

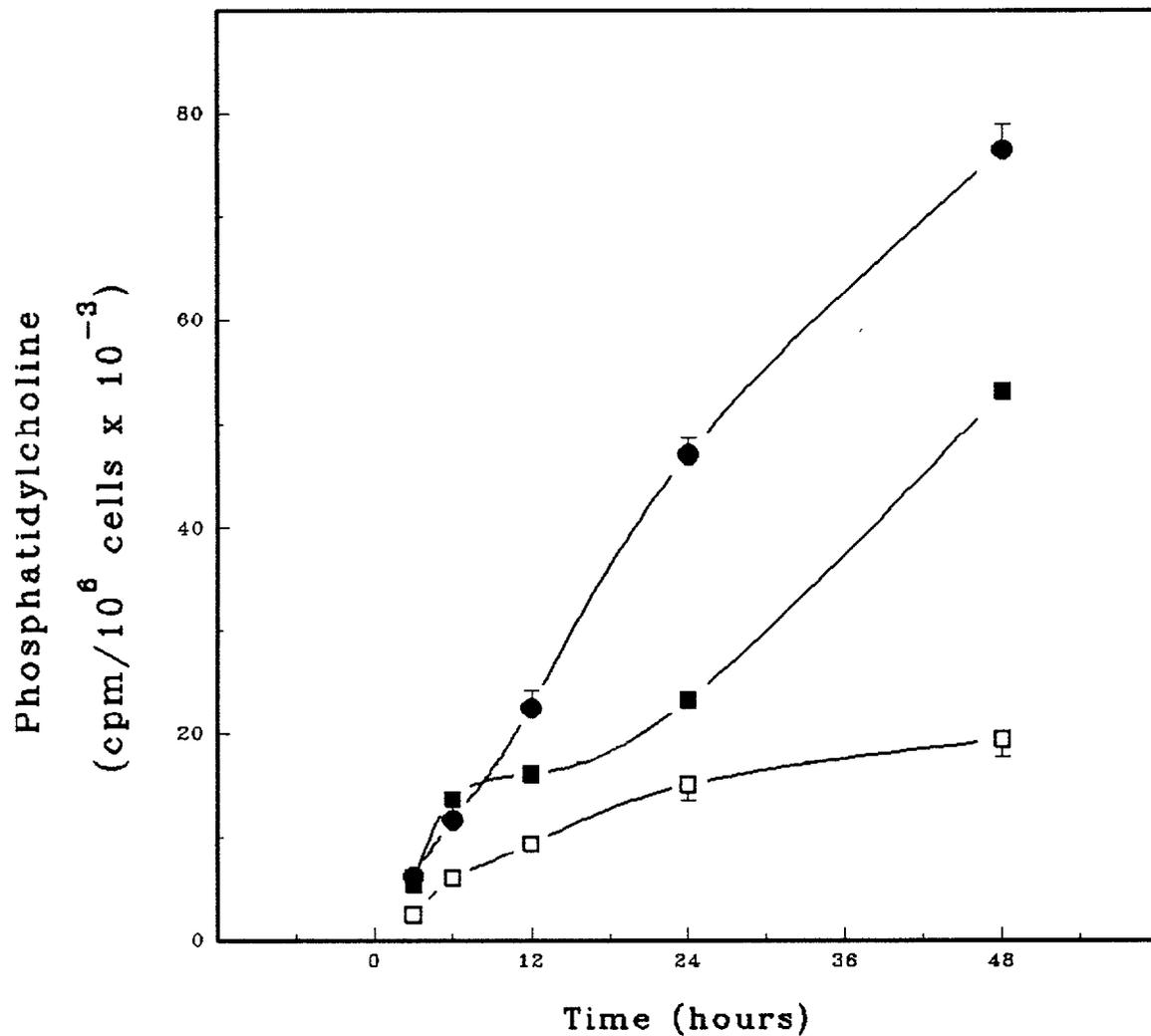


Fig. 9: Efectos de la FSH y el But₂cAMP sobre la síntesis de fosfatidilcolina. Las células granulosa (10⁶/placa) se cultivaron con 200 ng/ml de FSH (■—■), 0.3 mg/ml But₂cAMP (●—●), o medio (□—□), junto con 1μCi/ml de ¹⁴C-metil colina durante los tiempos indicados. La PC fué extraída y cuantificada como se describe en Material y Métodos y los resultados expresados como la media de las cpm ± SE.

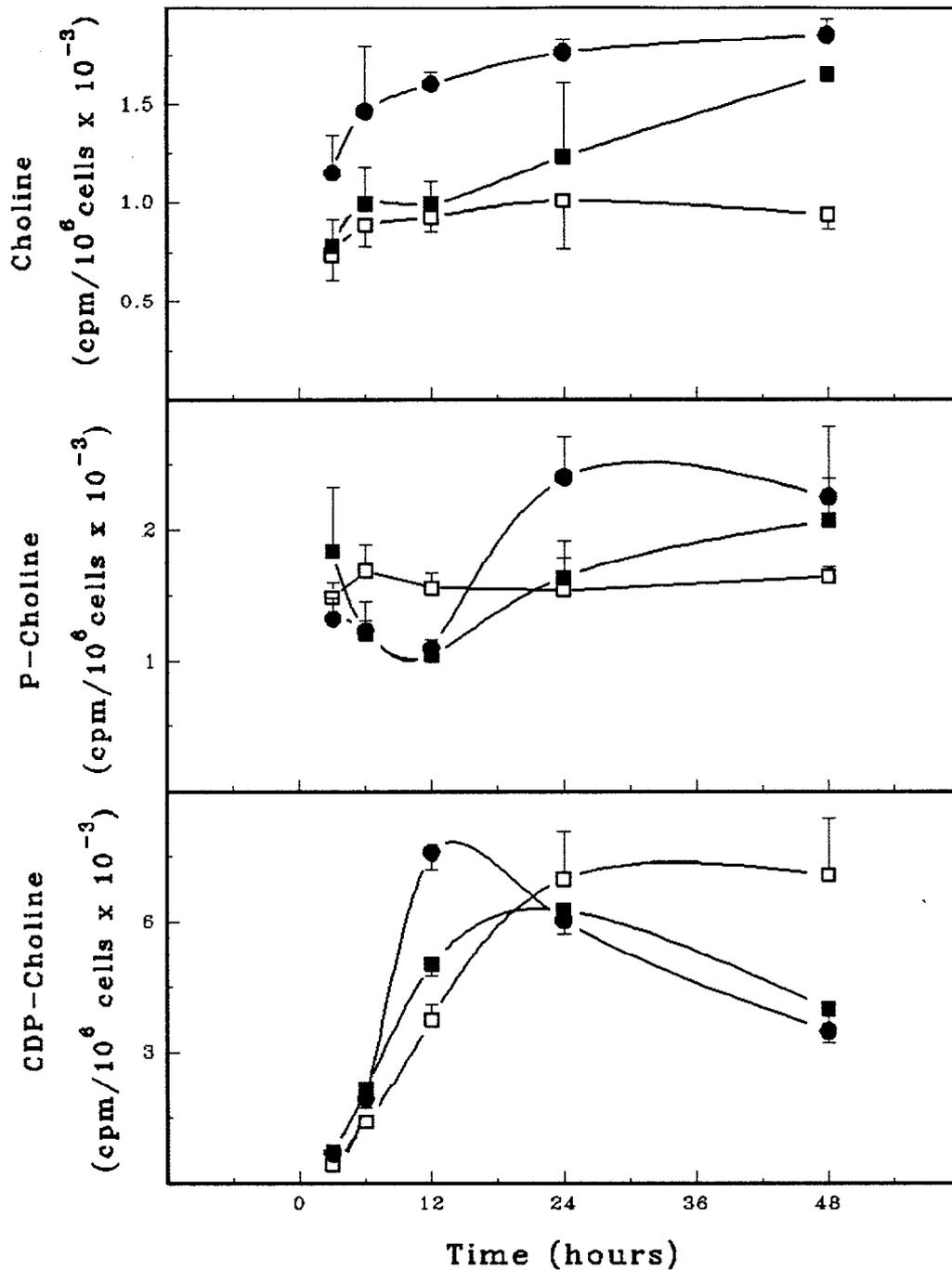


Fig. 10: Efectos de la FSH y el But₂cAMP sobre los intermediarios de la CDP-colina. Las células granulosa (10⁶/placa) se cultivaron con 200 ng/ml de FSH (■—■), 0.3 mg/ml But₂cAMP (●—●), o medio (□—□), junto con 1μCi/ml de ¹⁴C-metil colina durante los tiempos indicados. Colina, P-colina y CDP-colina fueron extraídas, separadas y contadas, y los resultados expresados como media de las cpm ± SE.

Puesto que los efectos de la FSH y el AMPc sobre el marcaje de fosfatidilcolina en célula granulosa ocurren a tiempos largos, y a pesar de que dichos efectos tienen lugar en condiciones de marcaje en las que se ha alcanzado el equilibrio isotópico, es necesario demostrar que los aumentos en el marcaje se corresponden a aumentos reales en la masa del fosfolípido, y no son consecuencia de un aumento en el recambio del lípido generado por la existencia de hidrólisis previa.

Para ello el método más comúnmente utilizado, lo constituye la medición de fósforo inorgánico, que ha sido previamente liberado del fosfolípido por digestión con calor en medio ácido, utilizando una curva patrón del mismo lípido. La sensibilidad del método utilizado, permite medir cantidades que van desde los 3.125 hasta los 100 nmol tubo (Fig. 6).

Para utilizar únicamente la parte central y más sensible de la curva, se cultivaron células granulosa en botellas de 25 cm² de superficie, que soportan cultivos de hasta 10⁷ células por botella. En estas condiciones y como se muestra en la Fig. 11, tanto la FSH como el But₂cAMP, aumentaron significativamente en un 50 y 70% respectivamente el contenido total de fosfatidilcolina de las células. Considerando el hecho de que el efecto de la FSH tiene posiblemente lugar sólo sobre la PC existente en la membrana plasmática, el cambio es de magnitud suficiente para permitir afirmar, que el efecto tiene lugar sobre la síntesis *de novo*.

Para establecer aún más firme este hecho, se probó la existencia de un efecto de FSH ó But₂cAMP sobre el recambio de PC. Para ello se marcaron células granulosa durante 48 h con ¹⁴C-metil colina, se lavaron los cultivos, y se reincubaron a tiempos crecientes y cortos desde los 5 a los 60 min, con objeto de observar si la hubiera desaparición del fosfolípido que indicara la existencia de una hidrólisis del mismo. Ni la FSH ni el But₂cAMP, produjeron cambios significativos en la cantidad de PC, a ninguno de los tiempos estudiados, lo que permite afirmar, que los efectos de la FSH tienen lugar sobre la síntesis *de novo*, y no son el reflejo de un recambio aumentado como consecuencia de la hidrólisis.

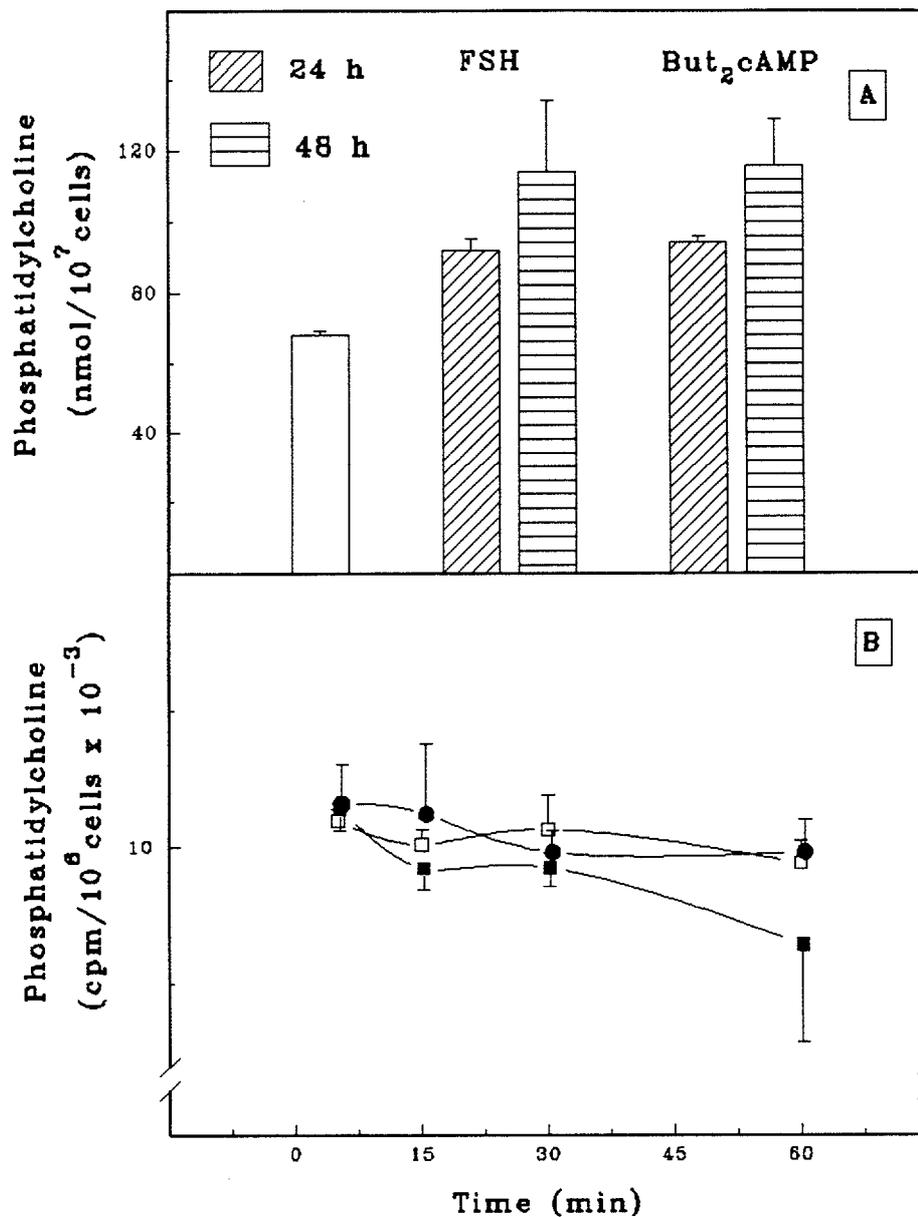


Fig. 11: Efectos de la FSH y el But₂cAMP sobre la masa total de fosfatidilcolina (A) y la hidrólisis de fosfatidilcolina a tiempos cortos.

En A, las células (10⁷/botella), se incubaron con FSH (200 ng/ml) o But₂cAMP (0.3 mg/ml) por los tiempos indicados. Los fosfolípidos se extrajeron la fosfatidilcolina se separó y cuantificó como se describe en Material y Métodos, y los resultados se expresan en la media de nmol ± SE. En B, las células (10⁶/placa), se incubaron durante 48 h con 1 μCi/ml de ¹⁴C-metil colina. Las células se lavaron, y medio con 200 ng/ml de FSH (■—■), 0.3 mg/ml de But₂cAMP (●—●), o solo (□—□), se añadió a los tiempos señalados. Tras extraer, separar y contar la PC, los resultados se expresan como la media de cpm ± SE.

La mayoría de las evidencias acumuladas en la literatura, afirman que el enzima limitante de la síntesis de PC por la ruta de la CDP-colina, la citidil transferasa, es desactivado por el AMPc a tiempos cortos, por lo que ante el hecho experimental de una activación de la síntesis de PC que ocurre a tiempos largos y por medio del AMPc, era necesario demostrar si tal activación tiene lugar por fosforilación o por un aumento de la síntesis del enzima.

Para estudiar lo anteriormente enunciado, se incubaron células granulosa con ^{14}C -metil colina, en medio sólo o en presencia de FSH (200 ng/ml) ó, FSH más ácido okadaico (10^{-9}M). El ácido okadaico, es un inhibidor de las fosfatasas de proteínas, PP1 y PP2A (), y potencia por tanto la mayoría de los efectos inducidos por fosforilación. No hubo, como se muestra en la Fig. 12, cambios en ninguno de los tiempos estudiados en la cantidad de ^{14}C -metil colina incorporada a PC por FSH en presencia de okadaico, lo que podría probar que el efecto del AMPc, no tiene lugar por fosforilación de la CT.

Puesto que los aumentos en la síntesis de PC ocurren a tiempos largos, y no tienen lugar por una activación por fosforilación del enzima limitante de la ruta de la CDP-colina, se quiso probar, si el efecto observado es dependiente de síntesis de proteínas, lo que hablaría en favor de la existencia de un aumento en la cantidad total del enzima.

Para ello se incubaron células granulosa durante 48 h con FSH y But_2cAMP con y sin 0.01 mg/ml de cicloheximida. Tras extraer, y cuantificar la PC marcada (Fig. 13), no se observaron cambios significativos en la cantidad de PC en los controles, en tanto que disminuciones de más del 50% en la cantidad de ^{14}C -metil colina incorporada a PC, pudo ser observada en las células con FSH ó But_2cAMP , en presencia de la cicloheximida. La autorradiografía de una de las cromatografías se muestra asimismo en la Fig. 13, como prueba visual de los resultados cuantificados en ella.

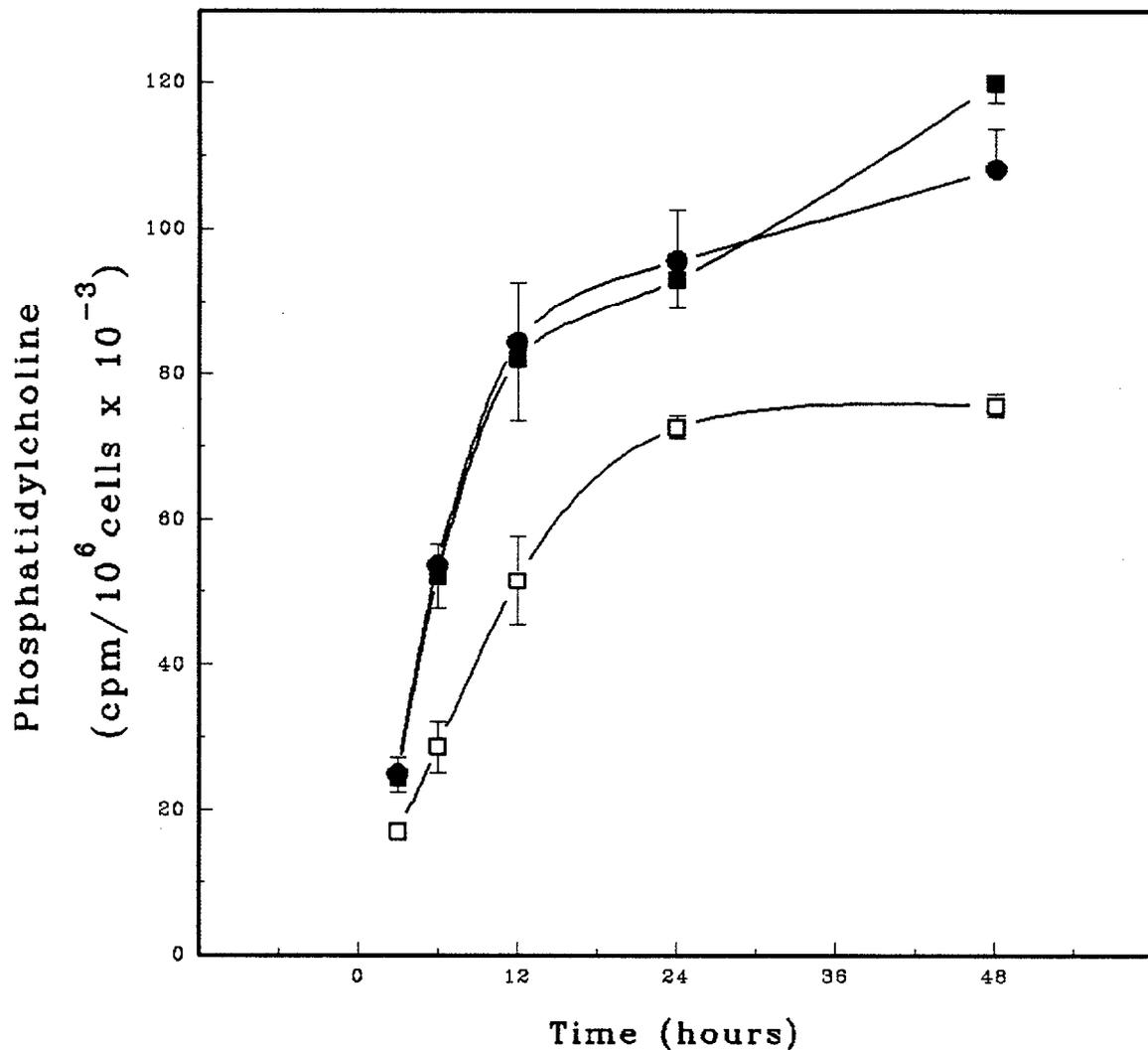


Fig. 12: Efectos del ácido okadaico sobre la síntesis de PC estimulada por FSH. Las células (10^6 /placa), se incubaron por los tiempos indicados con $1\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -metil colina, sola (□—□), unida a 200 ng/ml de FSH (■—■), ó FSH más 10^{-9}M de ácido okadaico (●—●). Los fosfolípidos se extrajeron, y la PC se separó y contó como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como la media de $\text{cpm} \pm \text{SE}$.

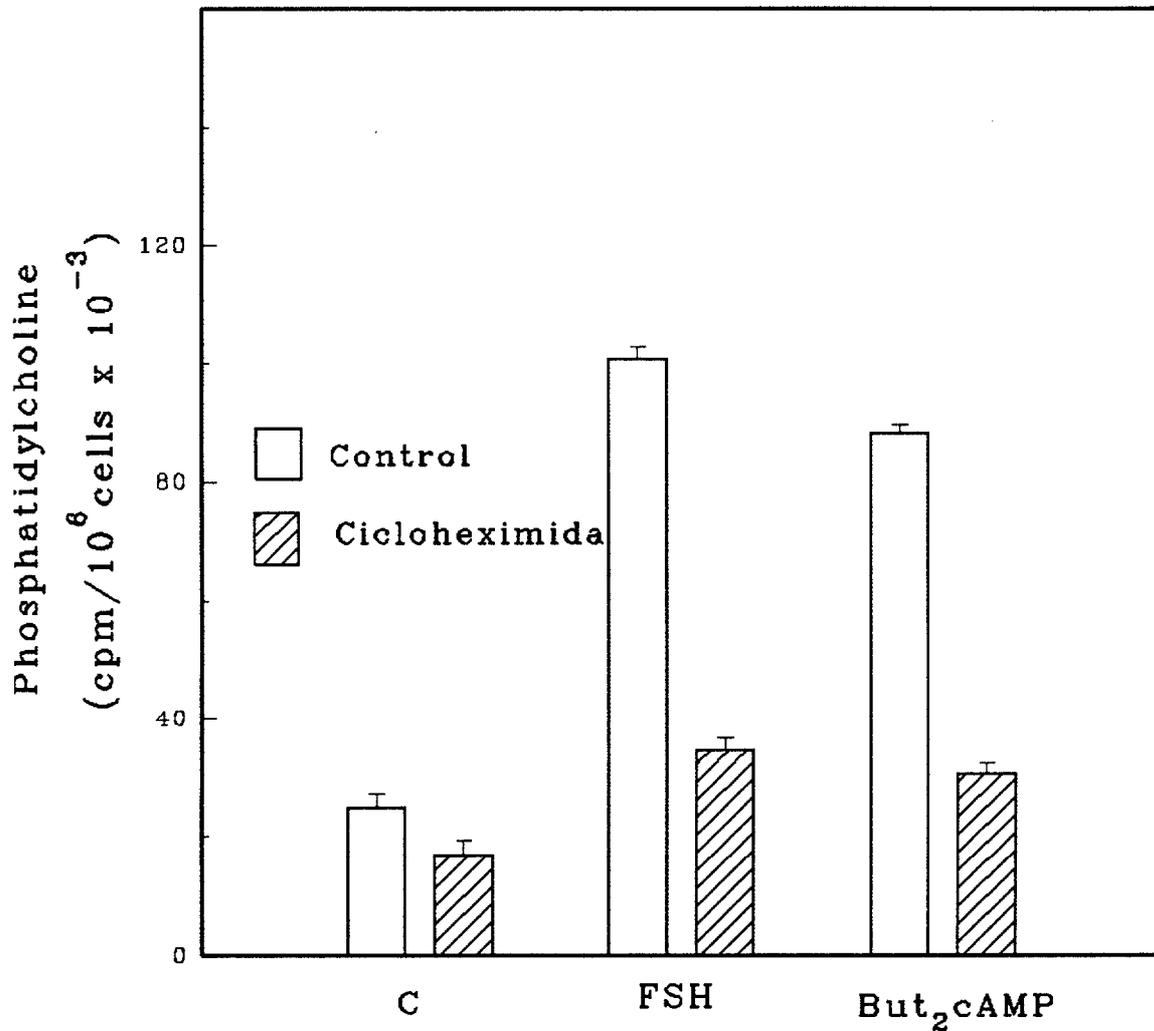


Fig. 13: Efectos de la cicloheximida en la síntesis de PC estimulada por FSH y But₂cAMP.

Las células granulosa (10⁶/placa), se cultivaron en medio con 1μCi/ml de ¹⁴C-metil colina, 200 ng/ml de FSH, o 0.3 mg/ml de But₂cAMP solos o en unión de 0.01 mg/ml cicloheximida. La PC se cuantificó, y los resultados se expresan como la media de cpm ± SE.

4.1.3. Especificidad del efecto observado

Se quiso probar a continuación que el efecto de la FSH sobre la síntesis de PC, no es un efecto común a otros fosfolípidos, a las hormonas activadoras de la esteroidogénesis, ó a las activadoras de la proliferación de la célula granulosa, y por tanto un epifenómeno.

Para ello se estudió en primer lugar el efecto de la FSH y el But₂cAMP sobre la síntesis de fosfatidiletanolamina (PE). La PE tiene una ruta de síntesis a partir de etanolamina prácticamente idéntica a la de la ruta de la CDP-colina para sintetizar PC. Es además el sustrato para la síntesis de la PC por la ruta de la transmetilación (Fig. 2). Por ello con cierta frecuencia, la síntesis de ambos fosfolípidos es regulada en una forma similar.

Se incubaron células granulosa en medio con ¹⁴C-cloruro de etanolamina, sólo o en presencia de FSH ó But₂cAMP, durante tiempos, que al igual que en las incubaciones con metil-colina que oscilaron desde 3 a 48 h. Se extrajo y cuantificó la PE y la PC, y en la Fig. 14, puede observarse que no hubo cambios en la cantidad de etanolamina incorporada a PE con ninguno de los tratamientos. Tampoco pudieron observarse cambios en la cantidad de PC sintetizada a partir de PE, lo que parece probar que el efecto de la FSH es específico para la síntesis de PC por la ruta de la CDP-colina.

Se estudiaron asimismo los efectos de una hormona el dietil-estilbestrol (DES), que es mitógena para la célula granulosa. En la Fig. 15, se muestra, que el DES produjo incrementos en la cantidad de ¹⁴C-metil colina incorporada a PC, sólo a las 48 h y en magnitudes (30%), muy discretas.

Para probar si el efecto de la FSH es común a otras hormonas activadoras de la esteroidogénesis, y que comparten igualmente el mismo mensajero intracelular, el AMPc, se estudiaron los efectos de la hCG, sobre la síntesis de fosfatidilcolina en células MA-10. Las células MA-10, son un clon inmortalizado, a partir de un tumor de células de Leydig

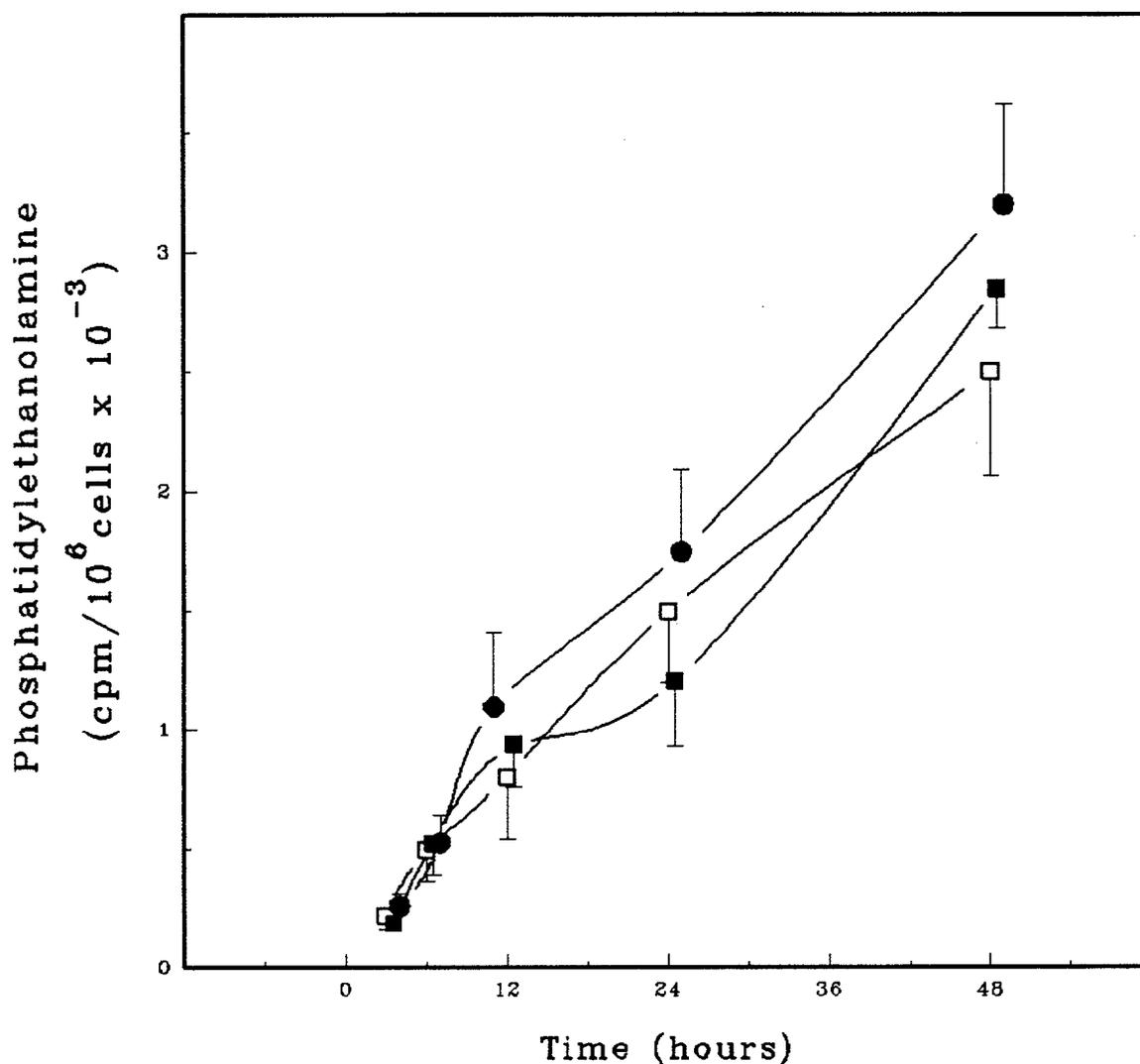


Fig. 14: Efectos de la FSH y el But₂cAMP sobre la síntesis de fosfatidiletanolamina. Las células granulosa (10⁶/placa) se cultivaron con 200 ng/ml de FSH (■—■), 0.3 mg/ml But₂cAMP (●—●), o medio (□—□), junto con 10 μ Ci/ml de ¹⁴C-cloruro de etanolamina durante los tiempos indicados. La PE fué extraída y cuantificada como se describe en Material y Métodos y los resultados expresados como la media de las cpm \pm SE.

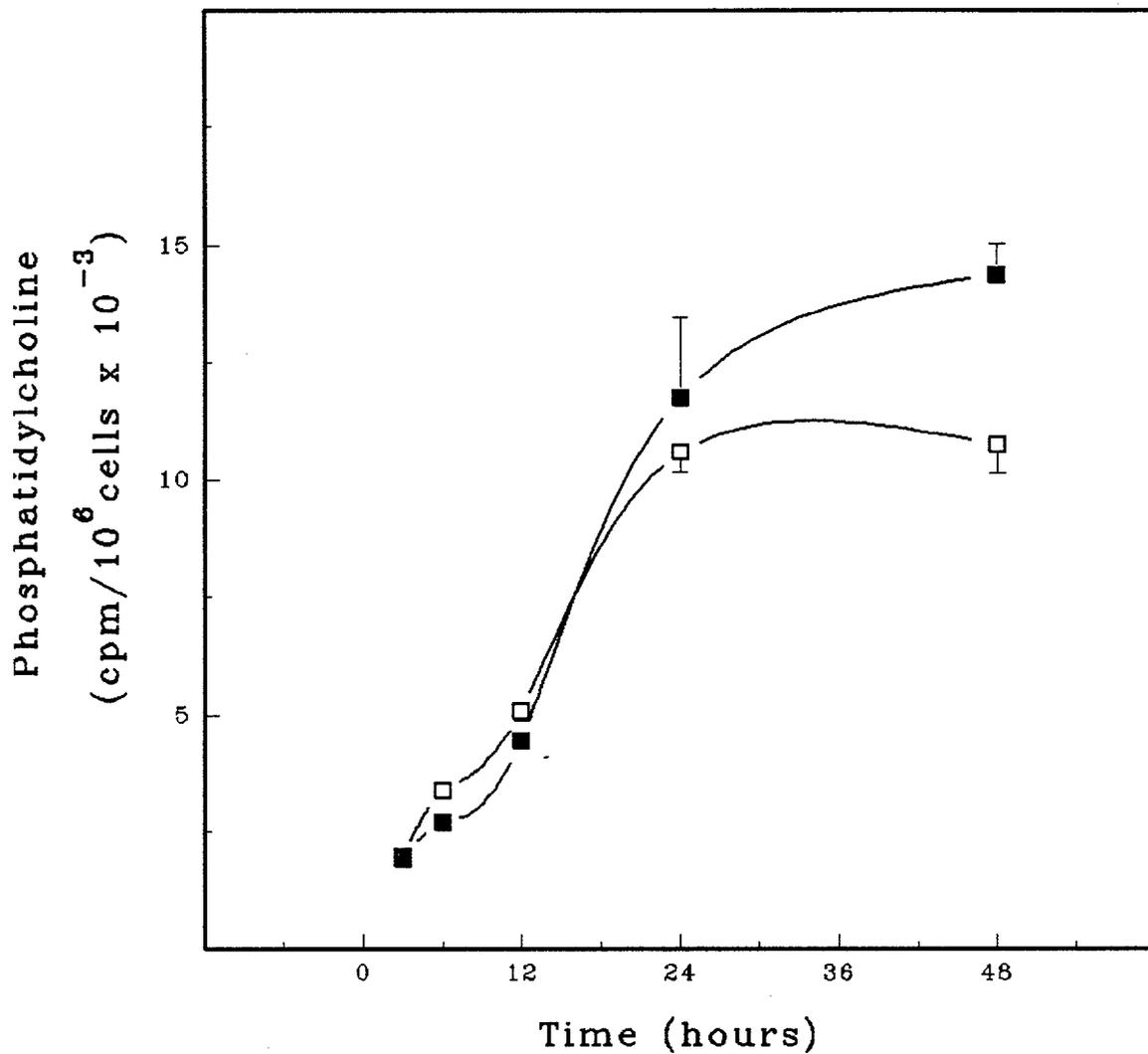


Fig. 15: Efectos del dietil-estilbestrol sobre la síntesis de PC.
Las células granulosa (10^6 /placa) se cultivaron con 10^{-6} M DES (■—■), o medio (□—□), junto con $1\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -metil colina durante los tiempos indicados. La PC fué extraída y cuantificada como se describe en Material y Métodos y los resultados expresados como la media de las $\text{cpm} \pm \text{SE}$.

desarrollado originalmente en ratón (Ascoli M, 1981a), y en las que la hCG/LH conserva su receptor acoplado a adenilato ciclasa, y capaz de estimular la esteroidogénesis tras unir la hormona. La LH/hCG, no tiene sin embargo en estas células capacidad mitogénica, lo que la convierte en un buen modelo para comparar los efectos de la hCG, con los de otra hormona que como la FSH para la célula granulosa, la ACTH para las células corticales de la adrenales, son además de esteroidogénicas, activadoras de la proliferación.

Se incubaron por tanto células MA-10 (1.5×10^6 /placa), en medio libre de suero durante los tiempos indicados en la Fig. 16, con ^{14}C -metil colina, en ausencia o presencia de hCG (200 ng/ml) ó But₂cAMP. Se extrajeron los lípidos, separó la PC y cuantificó la radioactividad asociada a su molécula. En ninguno de los tiempos estudiados se produjo variación alguna en la cantidad de ^{14}C -metil colina incorporada a PC, con el tratamiento con hCG ó But₂cAMP.

Por tanto la FSH estimula la síntesis de fosfatidilcolina en las membranas de células granulosa ovárica como un efecto específico, para este fosfolípido de entre los de estructura y vías de síntesis similares. El efecto es específico para la FSH y no tiene lugar para al menos otra hormona esteroidogénica estudiada, ni parece ser reproducido de forma idéntica por una hormona que como el DES es mitogénica para la célula granulosa.

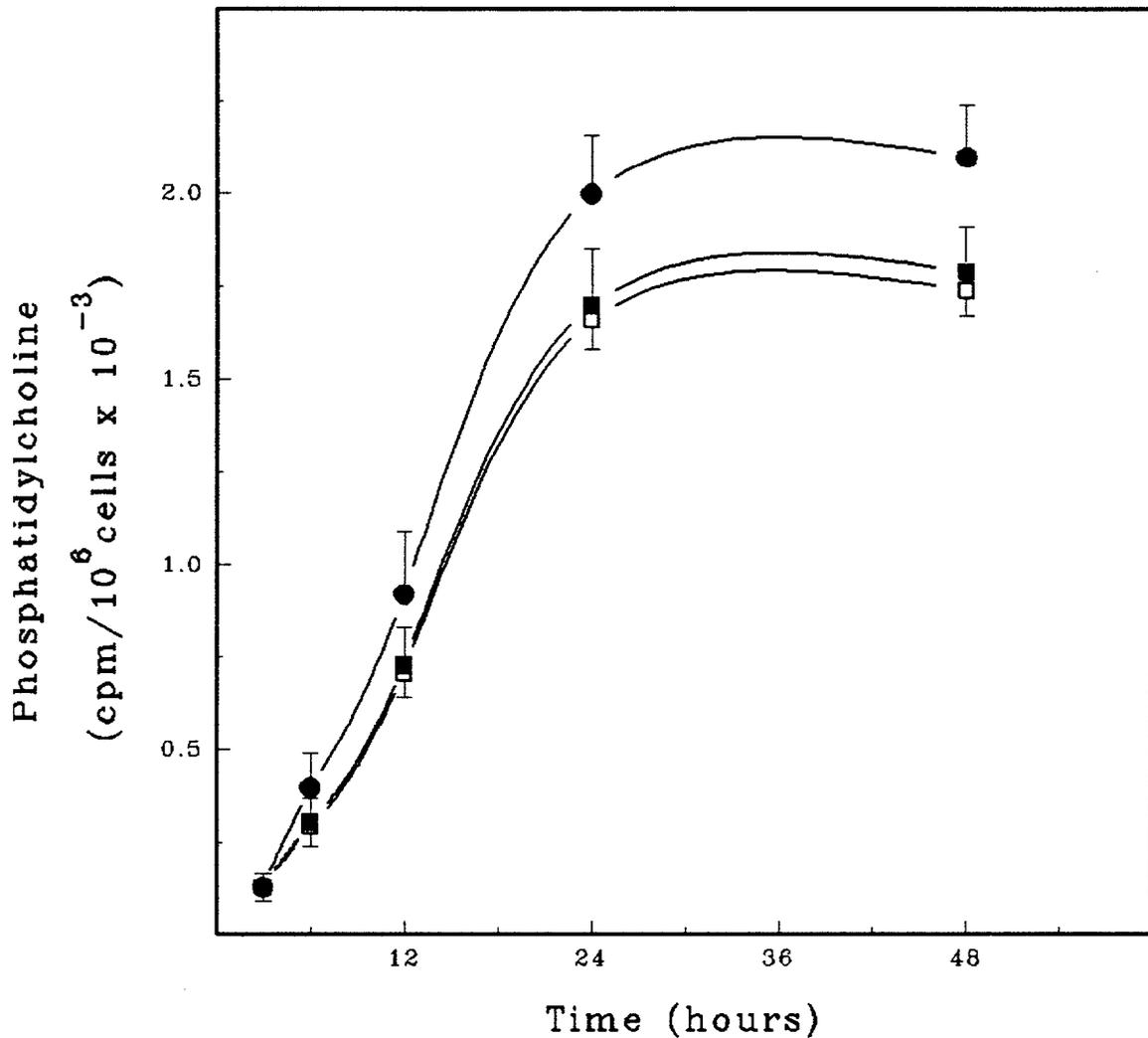


Fig. 16: Efectos de la hCG y el But₂cAMP en la síntesis de fosfatidilcolina en MA-10. Las células MA-10 (1.5/10⁶/placa) se cultivaron con 200 ng/ml de hCG (■—■), 0.3 mg/ml But₂cAMP (●—●), o medio (□—□), junto con 1μCi/ml de ¹⁴C-metil colina durante los tiempos indicados. La PC fué extraída y cuantificada como se describe en Material y Métodos y los resultados expresados como la media de las cpm±SE.

4.2 Efectos del LHRH sobre el ciclo de la fosfatidilcolina

El LHRH, pertenece al grupo de hormonas que, poseyendo un receptor acoplado a hidrólisis rápida de PIP_2 , produce al mismo tiempo aumentos prolongados del DAG. Por ello para estudiar los efectos del péptido sobre el ciclo de la PC en célula granulosa ovárica, se decidió estudiar primero la posibilidad de que esta hormona produjera hidrólisis de fosfatidilcolina, en tiempos compatibles con aquellos en los que se produce la acumulación del DAG en la célula.

4.2.1 Efectos del LHRH sobre la hidrólisis de fosfatidilcolina

Se incubaron células granulosa mantenidas en cultivo primario, durante 48 h con $1\mu Ci/ml$ de ^{14}C -metil colina, tras lo cual los cultivos se lavaron con medio y reincubaron desde 5 hasta 30 min con LHRH ($10^{-6}M$). La fosfatidilcolina y los productos de su hidrólisis se aislaron y cuantificaron en función de la radioactividad asociada a su molécula, y en la Fig. 17, se muestran los resultados de uno del al menos tres experimentos diferentes, en los que el LHRH, produjo la desaparición significativa de un 30% de la radioactividad asociada a la PC a los 15 min, habiéndose recuperado los niveles basales, transcurridos 30 min.

Paralelamente a la desaparición de PC se produjo, con el tratamiento con LHRH, una acumulación de colina del 100% con respecto a los controles, que se mantuvo durante todo el tiempo en el que realizó el experimento. No hubo por el contrario, ningún cambio en la cantidad de P-colina en el interior de las células. Estos resultados parecen confirmar una observación realizada anteriormente (Liscovitch M y Amsterdam A, 1989), acerca de la capacidad del LHRH para activar una PLD en célula granulosa ovárica, que rompería fosfatidilcolina para producir colina y ácido fosfatídico. Según los autores mencionados, el ácido fosfatídico, se acumularía en el interior de la célula, y podría ser utilizado por la célula granulosa, como mensajero intracelular, al igual que ocurre en otros tejidos (Billah MM et al, 1991).

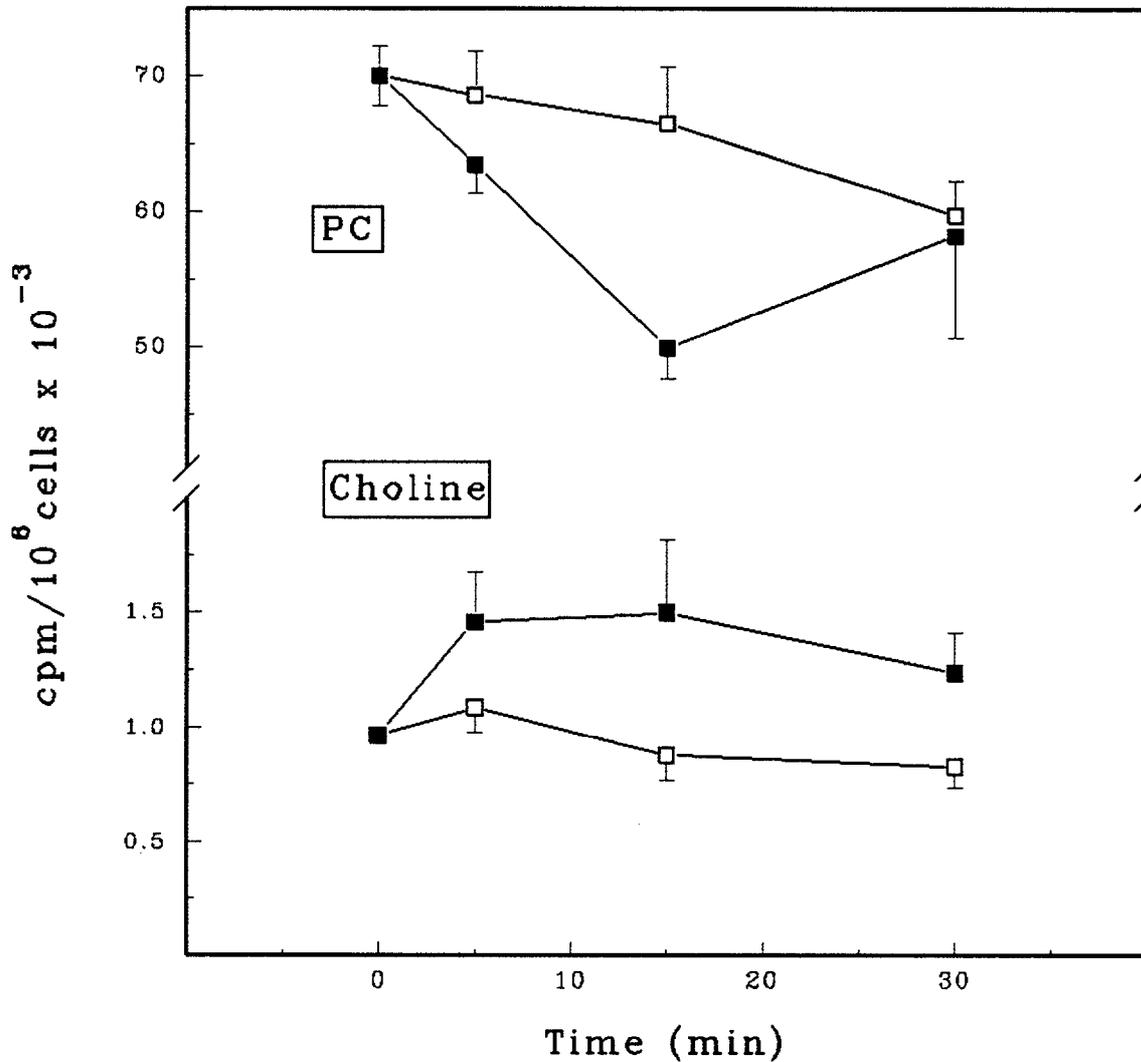


Fig. 17: Efectos del LHRH sobre el contenido e intermediarios de la síntesis de PC. Las células granulosa (10^6 /placa), se marcaron durante 48 h con $1\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -metil colina. Los cultivos se lavaron y el LHRH (10^6M), se añadió a los tiempos expresados. La PC, colina, P-colina y CDP-colina, se extrajeron, cromatografiaron y contaron como se describe en el Material y Métodos. Los resultados, se expresan en media de las $\text{cpm} \pm \text{SE}$.

Dado que el LHRH también acumula DAG con los mismos tiempos, se decidió estudiar la procedencia del DAG acumulado en respuesta a LHRH. Para ello, se incubaron células granulosa durante tres h, con $0.1\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -liso-PC, que se incorpora únicamente durante este tiempo a fosfatidilcolina (Fig. 4). El DAG que puede ser medido en la célula en estas condiciones, debe provenir únicamente de la molécula de fosfatidilcolina.

En la Fig. 18, se muestra una vez más, que tras la aplicación de LHRH (10^{-6}M) a las células granulosa marcadas con ^{14}C -liso-PC, se produce un descenso en la radioactividad asociada al fosfolípido, que no se hace patente hasta transcurridos 10 min de tratamiento de las células con el péptido. Igualmente, se muestra que existe una acumulación de DAG, que empieza a ser significativa a los 10 min, y se prolonga hasta los 30 min.

No pueden apreciarse sin embargo, cambios en la acumulación de DAG a tiempos cortos después de la aplicación del LHRH a los cultivos, lo que probaría que el DAG acumulado en esta fase, no proviene de PIP_2 , y sí de fosfatidilcolina.

Para probar si los efectos del LHRH sobre el contenido en PC y la acumulación de colina y DAG tienen lugar mediados por la activación de proteína quinasa C (PKC), se repitieron los mismos experimentos, utilizando el diéster de forbol miristato-acetato (PMA), que activa la proteína quinasa C muy rápidamente y de forma irreversible (), y es utilizado universalmente como activador del enzima.

Las células granulosa se incubaron con ^{14}C -metil colina durante 48 h, los cultivos se lavaron, y el PMA (10^{-7}M) se añadió a tiempos de 1, 2, 5, 10 y 15 min. Como se muestra en la Fig. 19, el PMA produjo una rápida (1 min) y significativa desaparición de la radioactividad asociada a la molécula de fosfatidilcolina, que se mantuvo durante todo el tiempo de realización del experimento. La activación directa de la PKC, fue por lo tanto más rápida y eficaz en, en romper fosfatidilcolina que el propio agonista que supuestamente activaría la hidrólisis del fosfolípido a través de una activación de la PKC.

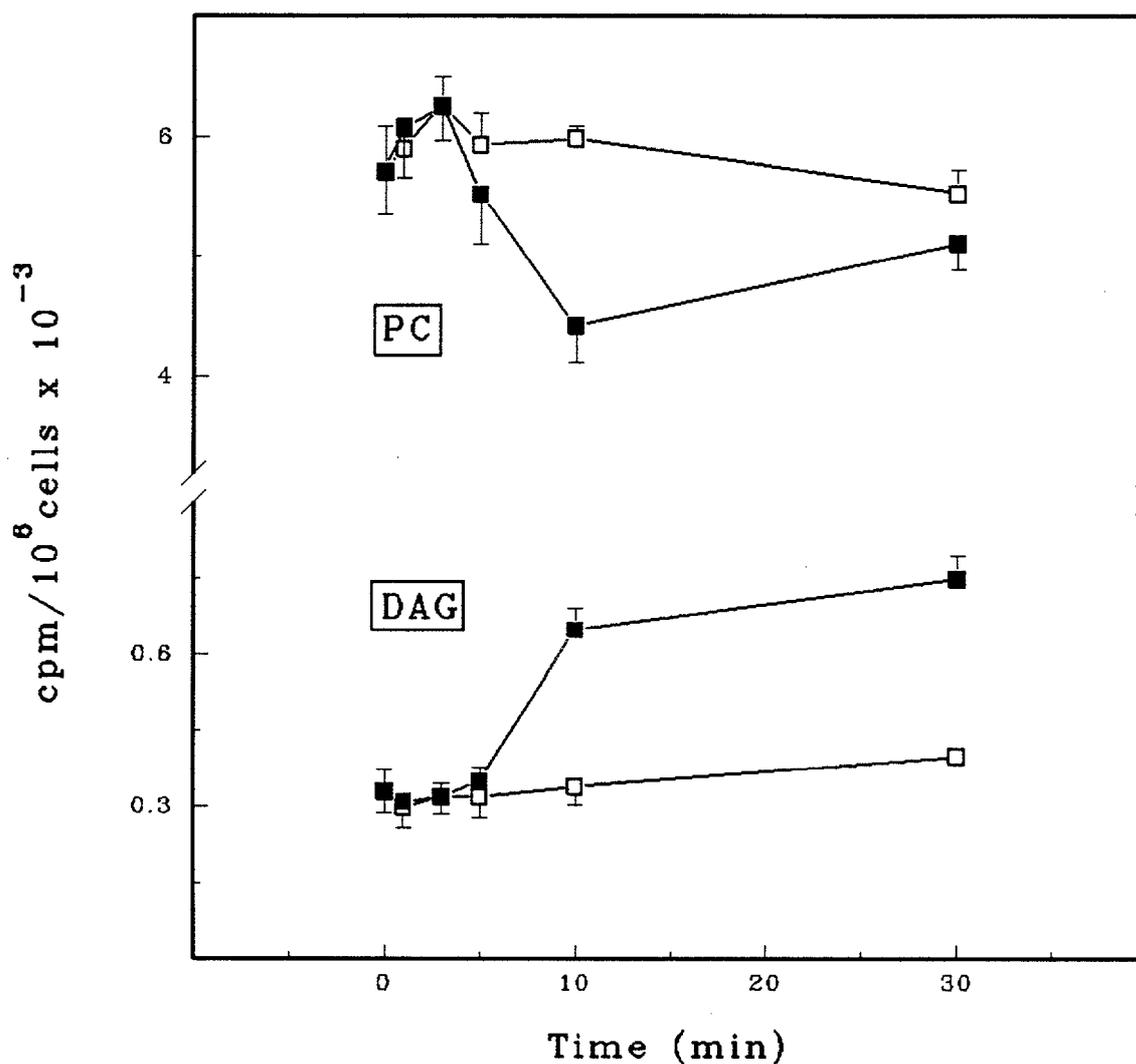


Fig. 18: Efectos del LHRH sobre el contenido y productos de la hidrólisis de PC. Las células granulosa (10^6 /placa), se marcaron durante 3 h con $0.1\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -liso-PC. Los cultivos se lavaron y el LHRH (10^6M), se añadió a los tiempos expresados. La PC, colina, P-colina y CDP-colina, se extrajeron, cromatografiaron y contaron como se describe en el Material y Métodos. Los resultados, se expresan en media de las $\text{cpm} \pm \text{SE}$.

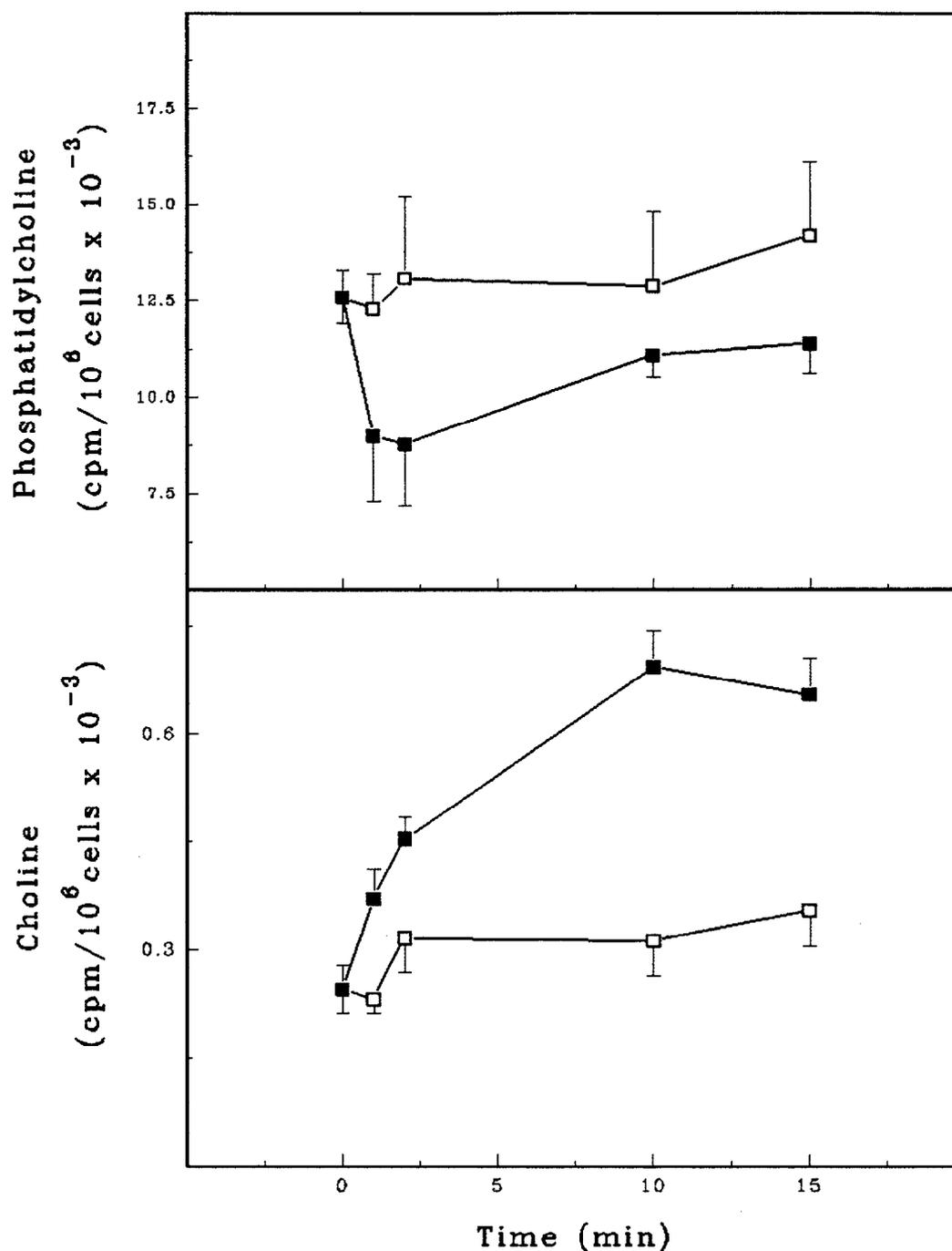


Fig. 19: Efectos del PMA sobre el contenido e intermediarios de la síntesis de PC. Las células granulosa (10^6 /placa), se marcaron durante 3 h con $0.1\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -liso-PC. Los cultivos se lavaron y el PMA (10^{-7}M), se añadió a los tiempos expresados. La PC, colina, P-colina y CDP-colina, se extrajeron, cromatografiaron y contaron como se describe en el Material y Métodos. Los resultados, se expresan en media de las $\text{cpm} \pm \text{SE}$.

Para probar si además de activar como el LHRH una PLD específica de fosfatidilcolina, el PMA es capaz asimismo de producir acumulación de DAG en la célula a los mismos tiempos en los que la genera el LHRH, las células granulosa se incubaron conjuntamente con ^3H -oleico ($0.1\mu\text{Ci/ml}$) y ^{14}C -liso-PC ($0.1\mu\text{Ci/ml}$), durante tres horas. Tras lavar los cultivos, para limpiar los isótopos no incorporados por las células, se reincubaron con PMA (10^{-7}M), durante 1, 2, 5, 10 y 30 min.

Tras extraer y cromatografiar el DAG, las muestras se contaron con un programa de doble isótopo, de forma que la radioactividad asociada al ^3H , es aquella del DAG que ha podido liberarse de todos los fosfolípidos de membrana, entre ellos naturalmente el PIP_2 y la PC, en tanto que el DAG marcado con ^{14}C , ha podido ser generado únicamente a partir de PC.

Los resultados se muestran en la Fig. 20, y en ellos puede observarse, que el LHRH produce acumulación de DAG en una forma bifásica, con el DAG generado a partir de PIP_2 (Fig. A), empezando a acumularse muy rápidamente (2 min), tras el tratamiento, y alcanzando el máximo a los 10 min, momento en el que también alcanza la máxima acumulación el DAG procedente de PC (Fig. B). Esto parecería confirmar la hipótesis de que el DAG medido en A, tiene distinta procedencia durante la primera fase (hasta los 10 min) que durante la segunda (de 10 hasta 30 min).

Por el contrario el DAG procedente de PIP_2 , y fosfolípidos en general, se acumula mucho más lentamente cuando las células han sido estimuladas con PMA, no existiendo acumulación durante los primeros 5 min, en una cronología coincidente con la del DAG procedente del lípido marcado con ^{14}C , que es la PC. Esto probaría, que la hidrólisis de PC, y la generación de DAG a partir de PC, ocurren como consecuencia de la activación de una PLD, y la transformación del PA en DAG por la acción de la PA: fosfohidrolasa y, que la secuencia de eventos que culminan con la generación de DAG, tiene lugar únicamente después de la activación de PKC.

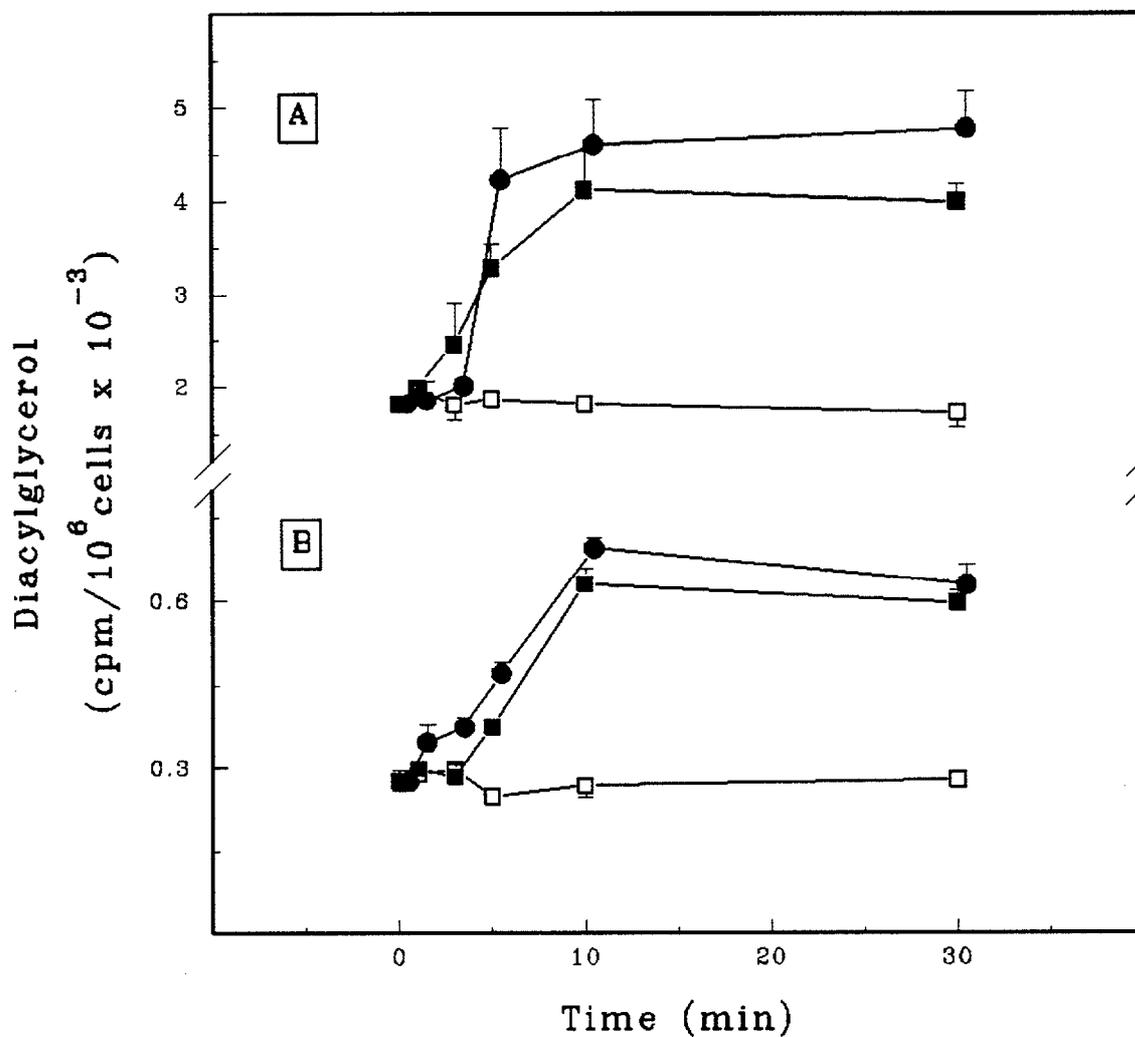


Fig. 20: Efectos del LHRH y el PMA sobre la generación de DAG. Las células granulosa (10^6 /placa), se marcaron durante 3 h con $0.1\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -oleico (A), y $0.1\mu\text{Ci}$ ^{14}C -liso-PC (B). Los cultivos se lavaron y 10^6M LHRH (■—■) o 10^7M PMA (●—●), se añadieron a los tiempos expresados. El DAG, se extrajo y cuantificó como se ha descrito. Los resultados se expresan como la media de las $\text{cpm} \pm \text{SE}$.

4.2.2 Efectos del LHRH sobre la síntesis de PC

Puesto que en algunas células, la activación de la hidrólisis de PC por PKC, sucede conjuntamente con un estímulo de la síntesis, quisimos investigar si este era el caso del LHRH, en célula granulosa. Para investigar este punto, las células granulosa se incubaron a tiempos crecientes desde 3 hasta 24 h con ^{14}C -metil colina ($1 \mu\text{Ci/ml}$), con LHRH (10^{-6}M), PMA (10^{-7}M).

Los resultados se muestran en la Fig. 21, y prueban que tanto el LHRH como el PMA, son capaces de estimular significativamente (100%), la incorporación de ^{14}C -metil colina a fosfatidilcolina después de las 24 h de tratamiento.

Para probar si el aumento de incorporación de ^{14}C -metil colina, es sólo un resultado de la activación del ciclo de la PC como consecuencia de la hidrólisis previa que ambos agonistas inducen, se midió la masa total de fosfatidilcolina, en 10^7 células tratadas con LHRH (10^{-6}M) ó PMA (10^{-7}M). En la Fig. 21 (interna), se muestra que tanto el LHRH como el PMA, aumentan la masa total de fosfatidilcolina en un 90%, después de las 48 horas de tratamiento.

De los resultados presentados, podría por tanto deducirse que el LHRH, induce la síntesis *de novo*, así como aumenta el recambio del lípido en célula granulosa y, que los efectos tienen lugar tras la hipotética activación de PKC, en respuesta a la unión del péptido con su receptor en la membrana citoplasmática.

La activación de la PKC, sería una consecuencia de la hidrólisis previa de PIP_2 , y liberación de DAG a partir de este fosfolípido producida al activarse una PLC específica asociada al receptor de LHRH, en célula granulosa ovárica.

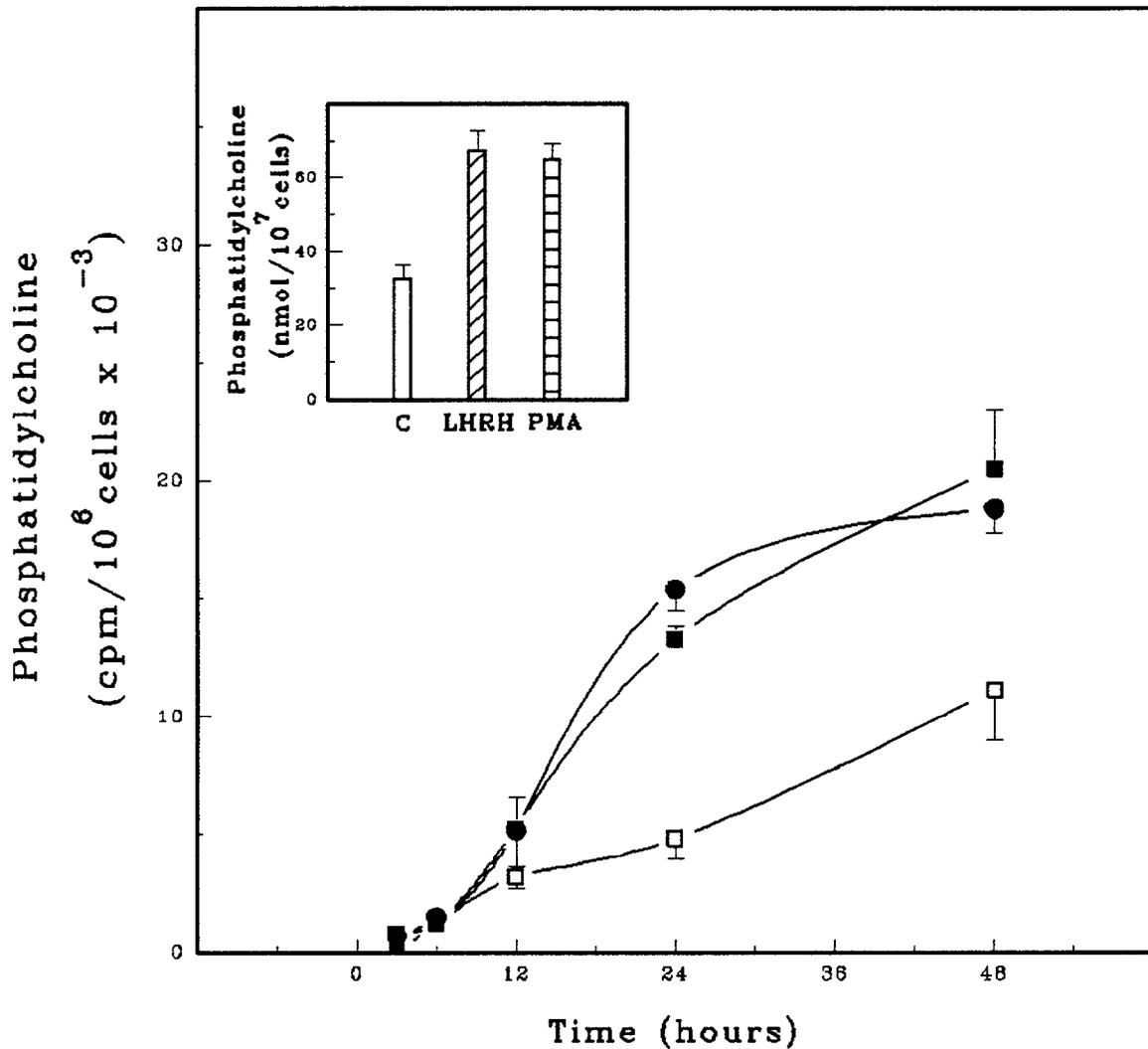


Fig. 21: Efectos del LHRH y el PMA sobre la síntesis de fosfatidilcolina.
 Las células granulosa (10^6 /placa) se cultivaron con 10^6 M LHRH (■—■), 10^7 M PMA (●—●), o medio (□—□), junto con 1μ Ci/ml de 14 C-metil colina durante los tiempos indicados. La PC fué extraída y cuantificada como se describe en Material y Métodos y los resultados expresados como la media de las $\text{cpm} \pm \text{SE}$.

4.2.3 Medida de la activación de proteína quinasa C por LHRH

Para probar que en efecto las acciones de LHRH sobre el ciclo de la fosfatidilcolina, tienen lugar a través de la activación de PKC, las células granulosa se incubaron con el péptido (10^{-6}M), durante los tiempos indicados en la Fig. 22. Las células se incubaron asimismo en presencia de PMA (10^{-7}M), que fué utilizado como control positivo de la activación clásica de la PKC.

Los experimentos se terminaron con tampon de ensayo frío, y el enzima se purificó parcialmente como se describe en el Material y Métodos. El PMA, produjo una activación rápida (5 min) y mantenida del enzima, disminuyendo su actividad en el citosol en más de un 50%, y apareciendo un incremento similar aunque no estequiométrico de la actividad asociada con la fracción de membranas.

EL LHRH, indujo igualmente una activación del enzima, que no fué aparente hasta los 10 min, con una translocación cronológicamente compatible del enzima a las membranas. La amplitud de la activación con LHRH, fué menor que con PMA, aunque se prolongó hasta los 30 min durante los que se realizó el experimento.

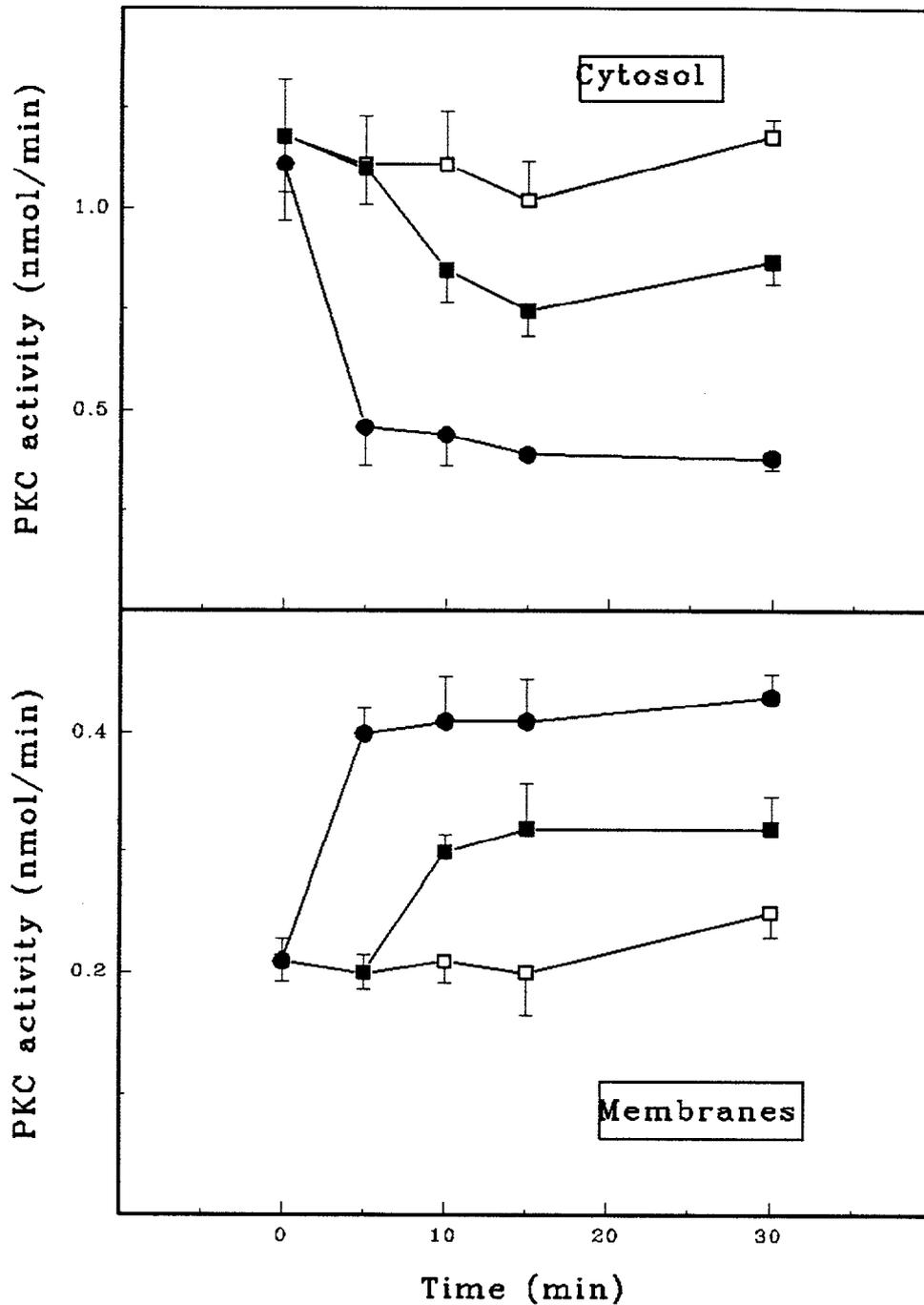


Fig. 22: Activación de la proteína quinasa C por LHRH y PMA. Las células granulosa (10^6 /placa), se incubaron a los tiempos indicados con medio (□—□), 10^{-6} M LHRH (■—■), ó 10^{-7} M PMA (●—●). Los experimentos se terminaron con tampon de ensayo frío y la actividad de citosol y membranas, medida como se describe en Material y Métodos, se expresa como la media de los nmol/min \pm SE.

DISCUSION

Se presentan evidencias en la presente Tesis Doctoral, de la existencia de una activación de la síntesis del que constituye el lípido mayoritario de las membranas, la fosfatidilcolina por la FSH, la hormona que inicia y mantiene la proliferación y diferenciación de la célula granulosa ovárica.

La síntesis de fosfatidilcolina depende básicamente de la actividad del enzima limitante de la ruta de la CDP-colina (Sundler R, Akesson B, 1975; Pelech SL, Vance DE, 1984), la citidil transferasa (CT). La activación de dicho enzima depende como ha sido demostrado en varios tipos celulares de su translocación desde un reservorio citoplasmático inactivo, a las membranas, donde se convierte en activa por interacción con los fosfolípidos de estas (Pelech SL et al, 1983; Sleight R, Kent C, 1983; Aeberhard EE et al, 1986; Cornell R, Vance DE, 1987; Chander A, Fisher AB, 1988; Tercé et al, 1988).

En condiciones basales, en ausencia de estímulo hormonal, tres factores regulan la translocación del enzima de o hacia las membranas inactivándola o activándola en consecuencia, i) el aumento en el contenido de colina (Yao Z et al, 1990) en el citoplasma celular y de fosfatidilcolina (Jamil H et al; 1990), induce la inactivación del enzima, ii) el enzima es modulada positivamente en forma no bien comprendida por los ácidos grasos (Pelech SL et al 1984; Weinhold PA et al, 1984; Anderson KE et al, 1985; Mock T et al, 1986), aunque evidencias recientes sugieren que un proceso de defosforilación está implicado en la activación (Wang Y et al, 1993), y iii) algunos pruebas experimentales sugieren que el diacilglicerol podría asimismo inducir directamente o a través de PKC, la activación del enzima (Kolesnick RN, Hemer MR, 1990; Utal AM et al, 1991).

La citidil transferasa se regula por fosforilación/defosforilación, y la proteína quinasa A es capaz de fosforilar en extractos celulares al enzima (Pelech SL, Vance DE, 1982), en residuos serina (Sanghera JS, Vance DE, 1989). Un inhibidor de las fosfatasa, el ácido okadaico, promueve asimismo la translocación del enzima a la fracción citosólica, y la inactivación del mismo (Hatch GM et al 1990, 1991).

La utilización de análogos no metabolizables del AMPc, y de los agonistas acoplados a la generación del nucleótido como el glucagon, inhiben la síntesis de PC, inactivando el enzima al producir la translocación desde la fracción microsomal que contiene las membranas, a la fracción citoplasmática soluble (Pelech SL et al, 1981; Pelech et al, 1984). Sin embargo no está aún claro si la inhibición del enzima causado por las hormonas acopladas a generación de AMPc y por los análogos no metabolizables de este, ocurre por fosforilación o indirectamente por disminución de los niveles celulares de DAG que a su vez regulan la síntesis por un mecanismo aun no desvelado (Jamil H et al, 1992).

Nosotros hemos presentado evidencias de que la FSH aumenta la incorporación de ^{14}C -metil colina al interior de la célula y a fosfatidilcolina, y tambien que el aumento en la incorporación se corresponde con aumentos similares en la masa real del fosfolípido, lo que probaría que los efectos de la hormona tienen lugar en dos puntos diferentes de la ruta de la CDP-colina, y se traducen en activación de la síntesis *de novo* de la PC.

Hemos probado que dichos efectos son mimetizados con exactitud por los análogos no metabolizables del AMPc, hecho este que está en aparente contradicción con los datos existentes en la literatura. Sin embargo, creemos haber probado tambien, aunque no definitivamente, que no es a través de una activación por fosforilación como el AMPc, y la FSH que induce su producción, activan la citidil transferasa, sinó aumentando el contenido total del enzima en la célula, como lo prueba el hecho de que los efectos de la FSH son totalmente contrarrestados con el uso de la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas.

Adicionalmente aunque la activación por fosforilación/defosforilación de la citidil transferasa es sensible en otros tejidos al ácido okadaico, como fué discutido anteriormente, la utilización de este, no produjo ningún efecto en la síntesis de PC estimulada por FSH, lo probaría aún más la independencia de procesos de fosforilación/defosforilación del efecto observado.

Alternativamente, el estímulo de la síntesis de PC por la FSH, podría ser una consecuencia del aumento del recambio del lípido, y no un aumento de la síntesis neta. Esta hipótesis puede ser asimismo descartada ante la ausencia de efectos a corto plazo de la FSH ó el AMPc, sobre la hidrólisis de fosfatidilcolina.

Finalmente es necesario señalar que, el lugar en el que se produce el estímulo de la síntesis del enzima, así como el propio hecho de que dicho estímulo exista, deben ser probados más firmemente en el futuro utilizando inhibidores selectivos de los distintos niveles a los que la síntesis de proteínas tiene lugar, cuantificando la cantidad del enzima y, de existir una sonda, la expresión del mensajero para la proteína.

En lo que se refiere a la regulación basal, no dependiente de estímulos hormonales de la citidil transferasa, en célula granulosa ovárica, no parece ser diferente de la que tiene lugar en otras células, como lo prueba indirectamente el hecho experimental observado por nosotros de que, la acumulación de CDP-colina disminuye, y la de P-colina aumenta, en los tiempos (24 y 48 h) en los que se produce la máxima estimulación del contenido en fosfatidilcolina en las membranas por parte de la FSH y el AMPc (Fig. 8 y 10).

En cuanto a la importancia del efecto observado, hemos intentado separarlo de los efectos metabólicos generales que la FSH tiene en célula granulosa, y definir su especificidad, para poder emitir la hipótesis de su relación con la regulación de alguno de los dos procesos básicos que la hormona controla en célula granulosa, relación que se discutirá después.

En primer lugar investigamos si el efecto pudiera ser parte de una regulación generalizada de la síntesis de fosfolípidos por la hormona. La fosfatidiletanolamina, fué elegida por las similitudes estructurales con la fosfatidilcolina, así como por la identidad de sus rutas de síntesis mayoritaria. No existe como se describió en los Resultados ningún efecto de la FSH ni del AMPc sobre la síntesis de fosfatidiletanolamina, lo que parecería probar la

especificidad, al menos en este aspecto, del observado con respecto a la fosfatidilcolina.

Se estudió asimismo el efecto de la LH/hCG, en otro tejido esteroideogénico, las células MA-10. En este tumor de células de Leydig, la LH/hCG, estimula al igual que la FSH en granulosa la síntesis de esteroides por un mecanismo dependiente de AMPc. Ni la hCG ni el AMPc fueron capaces de activar la síntesis de PC a partir de ^{14}C -metil colina en células MA-10, lo que probaría asimismo la especificidad de hormona y mensajero intracelular, observadas para la FSH.

Finalmente la utilización del DES produjo una discreta elevación de la incorporación de la ^{14}C -metil colina a fosfatidilcolina a las 48 h de tratamiento, sin embargo, este parece ser un efecto común a todos los esteroides, del cual se desconoce el significado en el momento presente, pero que tiene posiblemente más relación con un efecto trófico sobre la composición de las membranas celulares que con la existencia de un mecanismo de señalización acoplado a la hormona (Rooney SA et al, 1990).

El significado funcional del estímulo de la síntesis de PC por la FSH, es en este momento sólo una hipótesis. La FSH es el protagonista, en la célula granulosa, de la regulación de los dos fenómenos más importantes que tienen lugar en cualquier célula, el de la proliferación y la inducción de sus funciones diferenciadas.

Los niveles de fosfatidilcolina en las membranas celulares, y el contenido total del fosfolípido en las células, ha sido relacionado muy estrechamente con la síntesis y movimiento a través de las membranas de las lipoproteínas (Graham A et al, 1988; Vance JE, Vance DE, 1988; Yao ZM, Vance DE, 1989; Robinson BS et al, 1989). Puesto que estas moléculas constituyen la fuente más importante del colesterol celular, a partir del cual las células sintetizan los esteroides, uno de los posibles significados del aumento observado en el contenido en PC, pudiera ser el de facilitar la síntesis progesterona, que ya es inducida por la FSH a otros niveles. El hecho de que otra hormona esteroideogénica la LH/hCG, no

produzca ningún efecto sobre los niveles de PC, no apoyaría sin embargo esta primera hipótesis.

Aumentos en la síntesis de fosfatidilcolina, se han descrito en relación con procesos proliferativos en general (Tones MA et al, 1988; Lacal JC, 1990). El factor estimulador del crecimiento de colonias (CSF) aumenta la síntesis de PC y mRNA de CT en macrófagos y neutrófilos (Tessner TG et al, 1991). Puesto que la FSH es un enzima clave para la iniciación de la proliferación de la célula granulosa, el efecto sobre la PC, podría tener relación con esta función de la hormona.

Alternativamente y puesto que el diacilglicerol y la activación por este de proteína quinasa C, tienen efectos desdiferenciadores sobre la célula granulosa ovárica (Hsueh AJW et al, 1984), inhibiendo la síntesis de esteroides inducida por FSH (Flores JA et al, 1993), el aumento de la síntesis de PC podría estar siendo utilizado, como ya ha sido sugerido (Florin-Christensen J et al, 1993), como una forma de terminar la señal iniciada por los antagonistas de la diferenciación (que generan DAG), y permitir la diferenciación de la célula granulosa y el folículo, e impedir el fracaso de la maduración folicular y la atresia que le sigue.

El principal inductor de la desdiferenciación, de la célula granulosa es el LHRH (Hsueh AJW, Jones PBC, 1981), cuyo receptor está acoplado a hidrólisis de PIP_2 , y generación de DAG (Ma F, Leung CK, 1985; Davis JS et al, 1986). La acumulación de DAG en la célula granulosa en respuesta al LHRH (Fanjul LF et al, 1992), al igual que como se ha discutido sucede en otras muchas células, tiene lugar durante tiempos mucho más largos que los que serían compatibles con la hidrólisis de PIP_2 que el péptido es capaz de producir y, la observación de Liscovitch y Amsterdam (Liscovitch M Amsterdam AS, 1989) acerca de la existencia de producción activación de una PLD en respuesta a LHRH, hacen obvia enunciación de la hipótesis de que la acumulación de DAG debiera estar ocurriendo en forma bifásica y por transformación de moléculas diferentes.

Al igual que en todos las células y tejidos que fueron descritos en la Introducción de este trabajo, a los que podrían asimismo unirse miocitos y adipocitos en respuesta a la insulina (Farese RV et al, 1989), fibroblastos estimulados por EGF, PDGF y bombesina (Wright TM et al, 1990; Price BD et al, 1989), células glomerulosa en respuesta a la ACTH (Cozza EN et al, 1990), y probablemente la mayoría de las células de los organismos vivos, en lo que parece ser un mecanismo universal de producción de diacilglicerol y estímulo mantenido de PKC, la célula granulosa posee un mecanismo de señalización dependiente de hidrólisis secuencial de PC, que es activado por el LHRH.

Nuestros datos experimentales sugieren, confirmando lo observado por Liscovitch y Amsterdam, que la única fosfolipasa específica de PC que se activa es la PLD, y que la segunda fase de producción de DAG, cuya existencia creemos ha quedado suficientemente probada, sería consecuencia de la metabolización del PA, posiblemente tras la activación de la PA: fosfohidrolasa. Pruebas de la existencia de un mecanismo similar, han sido ya obtenidas en neutrófilos y células cromafines (Billah MM et al, 1989, Mullmann TJ et al, 1990a y 1990b; Tuominen RK et al, 1993), células endoteliales y músculo liso (Martin TW, Michaelis KM, 1988 y 1989; Lassègue et al, 1993) ó fibroblastos (Cabot MC et al, 1988b; Pettitt TR, Wakelam JO, 1993).

El efecto del LHRH es reproducido activando la PKC con ésteres del forbol, lo que sugiere que la hidrólisis de PIP_2 inducida por el LHRH, y la posterior activación de la PKC por el DAG liberado, constituirían el primer paso de la cascada de señales que culminan con la elevación continuada de los niveles de DAG en la célula granulosa.

Aunque era suficientemente obvio, hemos demostrado también, que el LHRH activa la proteína quinasa C, en tiempos compatibles con aquellos en los que se produce la primera liberación de diacilglicerol desde PIP_3 .

El diacilglicerol generado en células de neuroblastoma, cuando son sometidas a los efectos de la PLC, es capaz de aumentar la síntesis de fosfatidilcolina en estas células (Slack BE et al, 1991). La PLC y el PMA, aumentan igualmente la síntesis de fosfatidilcolina en células CHO (Jones GA, Kent C, 1991). En sentido contrario, se ha sido observado que la colecistoquinina, inhibe la síntesis de fosfatidilcolina para poder producir aumentos simultáneos de la cantidad de DAG existente en la célula (Matozaki T et al, 1991). Estas y otras muchas evidencias experimentales parecidas (Kolesnick RN, 1987, Kolesnick RN, Paley AE, 1987), junto con la observación de que el DAG en exceso en la célula se metaboliza preferentemente hacia fosfatidilcolina (Florin-Christensen J et al, 1993), mas el hecho observado repetidamente y ya discutido de que el diacilglicerol regula la actividad de la citidil transferasa (Jamil H et al, 1992), sugieren la emergente y atractiva hipótesis, de que si bien la hidrólisis de fosfatidilcolina, constituye un mecanismo extraordinariamente eficaz para mantener activada la proteína quinasa C, durante la regulación de funciones celulares que ocurren a largo plazo, el mismo diacilglicerol solo, o a través de la PKC, tendría la capacidad de limitar la señal e impedir su perpetuación en el tiempo, que conduciría inevitablemente a la desregulación de las funciones celulares, que pretenden regular, y eventualmente a la muerte de la célula.

De acuerdo con esta hipótesis, el mecanismo de activación de hidrólisis a corto plazo seguido de aumentos más duraderos de la síntesis de PC observado por nosotros para el LHRH en célula granulosa, supondría la confirmación de la existencia de una autorregulación o limitación de la señal generada tras la hidrólisis de fosfatidilcolina.

En el caso de la célula granulosa, a la cual el LHRH antagoniza, la FSH, reforzaría además el mecanismo de terminación de la señal, activando también la síntesis de fosfatidilcolina, y la atenuación por tanto de los procesos cuya activación/inactivación dependen de la PKC. Esta hipótesis apoyada en los datos ofrecidos por la literatura y sustentada por las evidencias obtenidas por nosotros que se han presentado en este trabajo, es coherente con las funciones que FSH y LHRH regulan en célula granulosa ovárica.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La FSH aumenta por un mecanismo dependiente de AMPc la síntesis de fosfatidilcolina en célula granulosa ovárica.
2. El aumento de la síntesis es un efecto específico, que tiene lugar por la ruta de la CDP-colina, y ocurre posiblemente por incrementos sensibles a cicloheximida, en la síntesis de la CDP: fosfocolina citidil transferasa, y no por activación a través de fosforilación del enzima
3. El LHRH utiliza la hidrólisis secuencial de la fosfatidilcolina, como forma de producir aumentos bifásicos y prolongados del DAG en la célula, de los que depende su efecto antagonista de la diferenciación de la granulosa.
4. El LHRH, activa asimismo la síntesis de fosfatidilcolina, posiblemente como una forma de terminar la señal previamente generada.
5. El mecanismo utilizado por el LHRH para regular el ciclo de la fosfatidilcolina, es dependiente la PKC, que el péptido activa despues de hidrolizar PIP₂.

BIBLIOGRAFIA

*AEBERHARD EE, BARRETT CT, KAPLAN SA AND SCOTT ML (1986) *Biochem Biophys Acta* 875: 6-11.

*ADASHI EY AND HSUEH AJW (1982) Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* 257: 6077-6083.

*ADASHI EY, RESNICK CE, BRODIE AMH, SVOBODA ME AND VAN WYK JJ (1985) Somatomedin-C mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 117: 2313-2320.

*ADASHI EY, RESNICK CE, D'ERCOLE AJ, SVOBODA ME AND VAN WYK JJ (1985) Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 6: 400-420.

*ADASHI EY, RESNICK CE, SVOBODA ME, VAN WYK JJ, HASCALL VC AND YAGISHITA M (1986) Independent and synergistic actions of somatomedin-C in the stimulation of proteoglycan biosynthesis by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 118: 456-458.

*AGWUN DE, McPHAIL LC, WYKLE RL AND McCALL CE (1989) *Biochem Biophys Res Commun* 159: 79-86.

AGWUN DE, McPHAIL LC, CHABOT MC, DANIEL LW, WYKLE RL AND MCCALL CE (1989) Choline-linked phosphoglycerides. *J Biol Chem* 264: 1405-1413.

*AMSTERDAM A, KENCHT M AND CATT KJ (1981) Hormonal regulation of cytodifferentiation and intercellular communication in cultured granulosa cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 78: 3000-3004.

Bibliografía

*AMSTERDAM A AND ROTMENSCH S (1987) Structure-function relationship during cell differentiation. *Endocr Rev* 8: 309-337.

*AMSTERDAM A, ROTMENSCH S AND BEN-ZE'EV A (1989) Coordinated regulation of morphological and biochemical differentiation in a steroidogenic cell: The granulosa cell model. *TIBS* 14: 377-382.

*ANDERSON KE, WHITLON DS AND MUELLER GC (1985) *Biochim Biophys Acta* 835: 360-367.

ANCELIN ML, PARANT M, THUET MJ, PHILIPPOT JR AND VIAL HJ (1991) Increased permeability to choline in simian erythrocytes after *Plasmodium knowlesi* infection. *Biochem. J.* 273: 701-709.

ANTHES JC, WANG P, SIEGEL MI, EGAN RW AND BILLAH MM (1991) Granulocyte phospholipase D is activated by a guanine nucleotide dependent protein factor. *Biochem and Biophys Res Commun* 175: 236-243.

*ASCOLI M (1981a) Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: Gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology* 108: 88-95.

*ASCOLI M (1981b) Regulation of Gonadotropin receptors and Gonadotropin responses in a clonal strain of Leydig tumor cells by Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem* 256: 179-183.

*ASCOLI M, PIGNATARO OP, SEGALOFF DL (1989) The inositol phosphate/diacylglycerol pathway in MA-10 Leydig tumor cells. Activation by arginine vasopressin and lack of effect of epidermal growth factor and human choriogonadotropin. *J Biol Chem* 264: 6674-6681.

- *ASEM EK, MOLNAR M AND HERTELENDY F (1987) Luteinizing hormone-induced intracellular calcium mobilization in granulosa cells: comparison with forskolin and 8-bromo-adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 120: 853-859.
- *ARNAUD R, WALKER P, KELLY PA AND LABRIE F (1983) Rat ovarian epidermal growth factor receptors: Characterization and hormonal regulation. *Mol Cell Endocrinol* 31: 43-52.
- *AUGERT G, BLACKMORE PF AND EXTON JH (1989a) Changes in the concentration and fatty acid composition of phosphoinositides induced by hormones in hepatocytes. *J Biol Chem* 264: 2574-2574 (1989).
- *AUGERT G, BOCKKINO SB, BLACKMORE PF AND EXTON JH (1989b) Hormonal stimulation of diacylglycerol in hepatocytes. *J Biol Chem* 264: 21689-21698.
- *BEHRMAN HR AND ARMSTRONG DT (1969) Cholesterol esterase stimulation by luteinizing hormone in luteinized rat ovaries. *Endocrinology* 85: 474-480.
- *BEN-AV P AND LISCOVITCH M (1989) *FEBS Lett* 259: 64-66.
- *BENDELL JJ AND DORRINGTON J (1988) Rat thecal/interstitial cells secrete a transforming growth factor- β -like factor that promotes growth and differentiation in rat granulosa cells. *Endocrinology* 123: 941-948.
- *BESTERMAN JM, DURONIO V AND CUATRECASAS P (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6785-6789.
- BALSINDE J, DIEZ E AND MOLLINEDO F (1991) Arachidonic acid release from diacylglycerol in human neutrophils. *J Biol Chem* 266: 15638-15643.

Bibliografía

*BILLAH MM, ECKEL S, MULLMANN TJ, EGAN RW AND SIEGEL MI (1989) *J Biol Chem* 264: 17069-17077.

*BILLAH MM, PAI J-K, MULLMANN TJ, EGAN RW AND SIEGEL MI (1989) *J Biol Chem* 264: 9069-9076.

*BILLAH MM AND ANTHES JC (1990) The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem J* 269: 281-291.

*BILLAH MM, ANTHES JC AND MULLMANN TJ (1991) Receptor-coupled phospholipase D: regulation and functional significance. *Biochem Soc Trans* 19: 324- 329.

*BIRNBAUMER L, SHAHABIN N, RIVER J AND VALE W (1985) Evidence for a physiological role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. *Endocrinology* 116: 1367-1370.

BLIGH EG AND DYER WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad J Biochem Physiol* 37: 911-917.

*BOCCKINO SB, BLACKMORE PF AND EXTON JH (1985) Stimulation of 1,2-diacylglycerol accumulation in hepatocytes by vasopressin, epinephrine, and angiotensin II. *J Biol Chem* 260: 14201-14207.

*BOCCKINO SP, BLACKMORE PF, WILSON PB AND EXTON JH (1987a) *J Biol Chem* 262: 15309-15315.

*BOCCKINO SP, WILSON PB AND EXTON JH (1987b) *FEBS Lett* 225: 201-204

*BOLLAG WB, BARRET PQ, ISALES CM, LISCOVITCH M AND RASMUSSEN H

Bibliografía

(1990) A potential role for phospholipase-D in the angiotensin-II-induced stimulation of aldosterone secretion from bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 127: 1436-1443.

***BOLLAG WB, BARRET P, ISALES CM AND RASMUSSEN H** (1991) Angiotensin-II-induced changes in diacylglycerol levels and their potential role in modulating the steroidogenic response. *Endocrinology* 128: 231-241.

***CABOT MC, WELSH CJ, ZHANG ZC, CAO HT, CHABBOTT H AND LEBOWITZ M** (1988a) Vasopressin, phorbol diesters and serum elicit choline glycerophospholipid hydrolysis and diacylglycerol formation in nontransformed cells: transformed derivatives do not respond. *Biochim Biophys Acta* 959: 46-57.

***CABOT MC, WELSH CJ, CAO H AND CHABBOTT H** (1988b) *FEBS Lett* 233: 153-157.

***CABOT MC, WELSH CJ, ZHANG Z AND CAO H** (1989) *FEBS Lett* 245: 85-90.

***CARNEGIE JA AND TSANG BK** (1983) Follicle-stimulating hormone-regulated granulosa cell steroidogenesis: Involvement of the calcium-calmodulin system. *Am J Obstet Gynecol* 145: 223-228.

***CARNEGIE JA AND TSANG BK** (1984) The calcium-calmodulin system: Participation in the regulation of steroidogenesis at different stages of granulosa cell differentiation. *Biol Reprod* 30: 515-522.

***CARNEGIE JA, DARDICK I AND TSANG BK** (1987) Microtubules and the gonadotropic regulation of granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 120: 819-828.

***CARROL J, WHITTINGHAM DG AND WOOD MJ** (1991) *J Reprod Fert* 92: 197-

Bibliografía

*CASPER RF AND ERICKSON GF (1981) In vitro heteroregulation of LH receptors by prolactin and FSH in rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 23 161-171.

*CENTOLA GM (1983) Structural changes: follicular development and hormonal requirements. En: *The Ovary G.B. Serra (Ed) Raven Press, New York* 95-111.

CLEVES A, MCGEE T AND BANKAITIS V (1991) Phospholipid transfer proteins: a biological debut. *Tren Cell Biol* 1: 30-34.

CLEVES AE, MCGEE TP, WHITTERS EA, CHAMPION KM, AITKEN JR, DOWHAN W, GOEBL M AND BANKAITIS VA (1991) Mutations in the CDP-choline pathway for phospholipid biosynthesis bypass the requirement for an essential phospholipid transfer protein. *Cell* 64: 789-800.

*COCKCROF S (1984) *Biochim Biophys Acta* 795: 37-46.

*COHEN P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Anun Rev Biochem* 58: 453-508.

COOK SJ AND WAKELAM MJO (1991) Hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase D is a common response to mitogens which stimulate inositol lipid hydrolysis in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochim Biophys Act* 1092: 265-272.

COOK SJ AND WAKELAM MJO (1992) Epidermal growth factor increases *sn*-1,2-diacylglycerol levels and activates phospholipase D-catalysed phosphatidylcholine breakdown in Swiss 3T3 cells in the absence of inositol-lipid hydrolysis. *Biochem J* 285: 247-253.

*CORNELL R AND VANCE DE (1987) *Biochim Biophys Acta* 919: 26-36.

CORNELL RB (1992) Cholinephosphotransferase from mammalian sources. *Meth Enzymol* 209: 267-273.

***COZZA EN, VILA MC, ACEVEDO-DUNCAN M, GOMEZ-SANCHEZ CE AND FARESE RV** (1990) ACTH increases de novo synthesis of diacylglycerol and translocates protein kinase C in primary cultures of calf adrenal glomerulosa cells. *J Steroid Biochem* 35: 343-351.

CUNNINGHAM TW AND MAJERUS PW (1991) Pathway for the formation of D-3 phosphate containing inositol phospholipids in PDGF stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 175: 568-576.

***CHAKRAVORTY A, MAHESH VB AND MILLS TM** (1991) *J Reprod Fert* 92: 323-

***CHANDER A AND FISHER AB** (1988) Choline-phosphate cytidyltransferase activity and phosphatidylcholine synthesis in rat granular pneumocytes are increased with exogenous fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 958: 343-351.

***CHOY PC, FARREN SB AND VANCE DE** (1979) *Can J Biochem* 57: 605-612.

***DANIEL LW, WAITE M AND WYKLE RL** (1986) *J Biol Chem* 261: 9128-9132.

***DARBON J-M, KNECHT M, RANTA T, DUFAU ML AND CATT KJ** (1984) Hormonal regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured ovarian granulosa cells. Effects of follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 259: 14778-14782.

DAVIDSON FF, LISTER MD AND DENNIS EA (1990) Binding and inhibition studies on lipocortins using phosphatidylcholine vesicles and phospholipase A₂ from snake venom,

pancreas, and a macrophage-like cell line. *J Biol Chem* 265: 5602-5609.

***DAVIS JS, FARESE RV AND CLARK MR (1983)** Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulates phosphatidylinositol metabolism in rat granulosa cells: Mechanism of action of GnRH. *Proc Nat Acad Sci USA* 80: 2049-2053.

***DAVIS JS, WEST LA AND FARESE RV (1984)** Effects of luteinizing hormone on phosphoinositide metabolism in granulosa cells. *J Biol Chem* 259: 15028-15034.

***DAVIS JS, WEST LA AND FARESE RV (1984)** Gonadotropin-releasing hormone rapidly alters polyphosphoinositide metabolism in rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 1289-1295.

***DAVIS JS, WEST LA AND FARESE RV (1986)** Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) rapidly stimulates the formation of inositol phosphate and diacylglycerol in rat granulosa cell: Further evidence for the involvement of Ca^{++} and protein kinase C in the action of GnRH. *Endocrinology* 118: 2561-2571.

***DIAZ-LAVIADA I, LARRODERA P, DIAZ-MECO MT, CORNET ME, GUDDAL PH, JOHANSEN T AND MOSCAT J (1990)** Evidence for a role of phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C in the regulation of protein kinase C by *ras* and *src* oncogenes. *EMBO J* 9: 3907-3912.

***DIAZ-LAVIADA I, LARRODERA P, NIETO JL, CORNET ME, DIAZ-MECO MT, SANCHEZ MJ, GUDDAL PH, JOHANSEN T, HARO A AND MOSCAT J (1991)** Mechanism of inhibition of cyclase by phospholipase C-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 266: 1170-1176.

***DORRINGTON JH AND GORE-LANGTON RE (1982)** Antigonadal action of prolactin:

Bibliografía

Further studies on the mechanism of inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in rat granulosa cell cultures. *Endocrinology* 110: 1701-1707.

*DUNLOP M AND METZ SA (1989) *Biochem Biophys Res Commun* 163: 922-928.

*EARDLEY DD AND KOSHLAND ME (1991) Glycosylphosphatidylinositol: A candidate system for interleukin-2 signal transduction. *Science* 251: 78-81.

*EKHOLM C, CLARK MR, MAGNUSSON C, ISAKSSON O AND LEMA-RIE WJ (1982) Ovulation induced by a gonadotropin releasing hormone analog in hypophysectomized rats involves prostaglandins. *Endocrinology* 110: 288-293.

*ERICKSON GF AND HSUEH AJW (1978) Stimulation of aromatase activity by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology* 102: 1275-

*ERICKSON GF, WANG C AND HSUEH AJW (1979) FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium. *Nature* 279: 336-338.

*ERICKSON GF (1983) Primary cultures of ovarian cells in serum-free medium as models of hormone-dependent differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 29: 21-49.

*EXTON JH (1990) Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J Biol Chem* 265: 1-4.

*FANJUL LF, RUIZ DE GALARRETA CM AND HSUEH AJW (1983) Progestin augmentation of gonadotropin-stimulated progesterone production by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 112: 405-407.

*FANJUL LF, DENIZ A, QUINTANA J, SANTANA P, GONZALEZ J ESTEVEZ F

AND RUIZ DE GALARRETA CM (1992) Diacylglycerol rather than Ca^{2+} mediates GnRH inhibition of FSH induced steroidogenesis in ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 198-204.

***FARESE RV, COOPER DR, KONDA TS, NAIR G, STANDAERT ML, DAVIS JS AND POLLET RJ** (1988) Mechanisms whereby insulin increases diacylglycerol in BC3H-1 myocytes. *Biochem J* 256(1): 175-184.

***FARESE RV, NAIR GP, SIERRA CG, STANDAERT ML, POLLET RJ AND COOPER DR** (1989) Insulin-like effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on [3H]2-deoxyglucose uptake, diacylglycerol generation and protein kinase C activation in BC3H-1 myocytes. *Biochem J* 261: 927-934.

FISK HA AND KANO-SUEOKA T (1992) Effect of membrane phosphatidylethanolamine-deficiency / phosphatidylcholine-excess on the metabolism of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *J Cell Physiol* 153: 589-595.

***FLORES JA, GARMEY JC, NESTLER JE AND VELDHUIS JD** (1993) Sites of inhibition of steroidogenesis by activation of protein kinase-C in Swine ovarian (granulosa) cells. *Endocrinology* 132: 1983-1989.

FLORIN-CHRISTENSEN J, FLORIN-CHRISTENSEN M, DELFINO JM, STEGMANN T AND RASMUSSEN H (1992) Metabolic fate of plasma membrane diacylglycerols in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 267: 14783-14789.

***FLORIN-CHRISTENSEN J, FLORIN-CRISTENSEN M, DELFINO JM AND RASMUSSEN H** (1993) New patterns of diacylglycerol metabolism in intact cells. *Biochem J* 289: 783-788.

FOSSATI P (1985) Phosphate determination by enzymatic colorimetric assay. *Anal Biochem* 149: 62-65.

***GARCIA DE HERREROS A, DOMINGUEZ I, DIAZ-MECO M, GRAZIANI G, CORNET ME, GUDDAL PH, JOHANSEN T AND MOSCAT J** (1991) Requirement of phospholipase C-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine for maturation of *Xenopus laevis* oocytes in response to insulin and *ras* p21. *J Biol Chem* 266: 6825-6829.

GEORGE TP, COOK HW, BYERS DM, PALMER FB StC AND SPENCE MW (1991) Channeling of intermediates in the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine biosynthesis in cultured glioma cells is dependent on intracellular Ca^{2+} . *J Biol Chem* 266: 12419-12423.

GEORGE TP, COOK HW, BYERS DM, PALMER FB StC AND SPENCE MW (1991) Inhibition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis by cytochalasin B in cultured glioma cells: potential regulation of biosynthesis by Ca^{2+} -dependent mechanisms. *Biochim Biophys Act* 1084: 185-193.

***GOLDENBERG RL, VAITUKAITIS JL AND ROSS GT** (1972) Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rat. *Endocrinology* 90: 1492-1498.

***GOSPADOROWICZ D III CR AND BRIDWELL CR** (1977a) Effect of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro I. Characterization of the response granulosa cell for FGF and EGF. *Endocrinology* 100: 1108-1120.

***GOSPADOROWICZ D III CR AND BRIDWELL CR** (1977b) Effect of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro II. Proliferative response of luteal cells to FGF but no EGF. *Endocrinology* 100: 1121-1128.

***GOSPADOROWICZ D AND BIALECKI H** (1979) Fibroblast and epidermal growth

factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. *Endocrinology* 104: 757-764.

***GRAHAM A, ZAMMIT VA AND BRINDLEY DN** (1988) Fatty acid specificity for the synthesis of triacylglycerol and phosphatidylcholine and for the secretion of very-low-density lipoproteins and lysophosphatidylcholine by cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 249: 727-733.

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

***GRIENGLING KK, RITTENHOUSE SE, BROCK TA, EKSTEIN LS, GIMBRONE MA AND ALEXANDER RW** (1986) *J Biol Chem* 261: 5901-5906.

***GRILLONE LR, CLARK MA, GODFREY RW, STASSEN F AND CROOKE ST** (1988) Vasopressin induces V1 receptors to activate phosphatidylinositol and phosphatidylcholine-specific phospholipase C and stimulates the release of arachidonic acid by at least two pathways in the smooth muscle cell line, A-10. *J Biol Chem* 263: 2658-2663.

***GROVE RI AND SCHIMMEL SD** (1982) *Biochim Biophys Acta* 711: 272-280.

***GUY GR AND MURRAY AW** (1982) *Cancer Res* 42: 1980-1985

***HATA A, AKITA Y, SUZUKI K AND OHNO S** (1993) Functional divergence of protein kinase C (PKC) family members. *J Biol Chem* 268: 9122-9129.

***HATCH GM, LAM TS, TSUKITANI Y AND VANCE DE** (1990) *Biochim Biophys Acta* 1042: 374-379.

Bibliografía

***HATCH GM, TSUKITANI Y AND VANCE DE (1991)** The protein phosphatase inhibitor, okadaic acid, inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Act* 1081: 25-32.

***HERNADEZ ER, ROBERTS CT, LEROITH D AND ADASHI EY (1989)** Rat ovarian insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression is granulosa cell-selective: 5'-untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation. *Endocrinology* 125: 572-574.

HESS H AND DERR JE (1975) Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomole range. *Anal Biochem* 63: 607-613.

***HICKEY GJ, KRASNOW JS, BEALTTIE W AND RICHARDS JS (1990)** Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5'genomic DNA. *Mol Endocrinol* 4: 3-12.

***HILLENSJÖ T, EKHOLM C AND HEDIN L (1984)** Effect of gonadotropin releasing hormone upon the pattern of steroidogenesis in isolated preovulatory rat follicles. *Acta Endocrinol* 14: 105-111.

***HSUEH AJW, WANG C AND ERICKSON GF (1980)** Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptors and aromatase activity in rat granulosa cells. *Endocrinology* 106: 1697-1705.

***HSUEH AJW AND JONES PBC (1981)** Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev* 2:437-461.

***HSUEH AJW, WELSH TH AND JONES PBC (1981)** Inhibition of ovarian and testicular

steroidogenesis by epidermal growth factor. *Endocrinology* 108: 2002-2004.

***HSUEH AJW, ADASHI EY, JONES PBC AND WELSH TH (1984)** Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5: 76-127.

***HSUEH AJW, LIU Y-X, CAJANDER S, PENG X-R, DAHL K KRISTENSEN P AND NY T (1988)** Gonadotropin-releasing hormone induces ovulation in hypophysectomized rats: Studies on ovarian tissue-type plasminogen activator activity, messenger ribonucleic acid content, and cellular localization. *Endocrinology* 122: 1486-1495.

HUANG C AND CABOT MC (1990) Phorbol diesters stimulate the accumulation of phosphatidate, phosphatidylethanol, and diacylglycerol in three cell types. *J Biol Chem* 265: 14858-14863.

***HUG H AND SARRE TF (1993)** Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 291: 329-343.

***HUNZICKER-DUNN M AND BIRNBAUMER L (1976)** Adenylyl cyclase activities in ovarian tissues III. Regulation of responsiveness to LH, FSH and PGE₁, in the prepuberal, cycling pregnant and pseudopregnant rat. *Endocrinology* 99: 198-210.

***JAMIL H, YAO Z AND VANCE DE (1990)** Feedback regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase translocation between cytosol and endoplasmic reticulum by phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 265: 4332-4339.

***JAMIL H, UTAL AK AND VANCE DE (1992)** Evidence that cyclic AMP-induced inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis is caused by a decrease in cellular diacylglycerol levels in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 267: 1752-1760.

Bibliografía

***JOHNSTON RF, PICKETT SC, BARKER DL (1990)** Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis* 11:355-360

***JONES GA AND KENT C (1991)** The role of protein kinase C in the stimulation of phosphatidylcholine synthesis by phospholipase C. *Arch Biochem Biophys* 288: 331-336.

***JONES PBC AND HSUEH AJW (1980)** Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon luteal luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 107: 1930-1936.

***JONES PBC AND HSUEH AJW (1981)** Direct stimulation of ovarian progesterone-metabolizing enzyme by gonadotropin-releasing hormone in cultured granulosa cells. *J Biol Chem* 256: 1248-1254.

***JONES PBC AND HSUEH AJW (1981)** Regulation of progesterone metabolizing enzymes by adrenergic agents, prolactin and prostaglandins in cultured rat ovarian granulosa cell. *Endocrinology* 109: 1347-

***JONES PBC AND HSUEH AJW (1982)** Regulation of ovarian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity by gonadotropin-releasing hormone and follicle-stimulating hormone in culture rat granulosa cells. *Endocrinology* 110: 1663-1671.

KANAHO Y, TAKAHASHI K, TOMITA U, IIRI T, KATADA T, UIM AND NOZAWA Y (1992) A protein kinase C inhibitor, staurosporine, activates phospholipase D via a Pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein in rabbit peritoneal neutrophils. *J Biol Chem* 267: 23554-23559.

***KASSON BG, CONN PM AND HSUEH AJW (1985)** Inhibition of granulosa cell differentiation by dioctanoylglycerol a novel activator of protein kinase C. *Mol Cell*

Endocrinol 42: 29-37.

***KEEL BA, EDDY KB, CHO S AND MAY JV** (1991) *Endocrinology* 129: 217-

***KENIGSBERG D, ROSENWAKS Z AND HODGEN D** (1989) The ovary: development and control of follicular maturation and ovulation. *Endocrinology*. *L.J. DeGroot (Ed.) W.B. Saunders Company, Philadelphia* 1915-1939.

KHAN ZU AND HELMKAMP GM Jr (1990) Stimulation of cholinephosphotransferase activity by phosphatidylcholine transfer protein. Regulation of membrane phospholipid by a cytosolic protein. *J Biol Chem* 265: 700-705.

KISS Z AND ANDERSON WB (1990) ATP stimulates the hydrolysis of phosphatidylethanolamine in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 265: 7345-7350.

***KISS Z, CHATTOPADHYAY J AND PETTIT GR** (1991) Stimulation of phosphatidylcholine synthesis by activators of protein kinase C is dissociable from increased phospholipid hydrolysis. *Biochem J* 273: 189-194.

KISS Z (1992) Differential effects of platelet-derived growth factor, serum and bombesin on phospholipase D-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine in NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem J* 285: 229-233.

***KNECHT M, KATZ MS AND CATT KJ** (1981) Gonadotropin-releasing hormone inhibits cyclic nucleotide accumulation in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* 256: 34-36.

***KNECHT M, AMSTERDAM A AND CATT KJ** (1981) The regulatory role of cyclic AMP in hormone-induced granulosa cell differentiation. *J Biol Chem* 256: 10628-10633.

Bibliografía

*KNECHT M AND CATT KJ (1981) Gonadotropin-releasing hormone: regulation of adenosine 3',5'-monophosphate in ovarian granulosa cells. *Science* 214: 1346-1348.

*KNECHT M, RANTA T AND CATT KJ (1983a) Granulosa cell differentiation in vitro: Induction and maintenance of follicle-stimulating hormone receptors by adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 113: 949-956.

*KNECHT M, RANTA T AND CATT KJ (1983b) Hormonal regulation of a plasma membrane phosphodiesterase in differentiating granulosa cells. *J Biol Chem* 258: 12420-12426.

*KNECHT M, RANTA T, KATZ MS AND CATT KJ (1983) Regulation of adenylate cyclase activity by follicle-stimulating hormone and a gonadotropin-releasing hormone agonist in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 112: 1247-1255.

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

*KNECHT M, RANTA T, FENG P, SHINOHARA O AND CATT KJ (1985) Gonadotropin-releasing hormone as a modulator of ovarian function. *J Steroid Biochem* 23: 771-778.

*KNECHT M, SHINOHARA O AND CATT K (1986) Biosynthesis of cellular and secreted proteins during follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 119: 1388-1396.

*KOLENA J AND CHANNING CP (1972) Stimulatory effects of LH, FSH and prostaglandins upon 3'-5'-AMP levels in porcine granulosa cells. *Endocrinology* 90: 1543-

1550.

KOLESNICK RN (1987) Thyrotropin-releasing hormone and phorbol esters induce phosphatidylcholine synthesis in GH₃ pituitary cells. *J Biol Chem* 262: 14525-14530.

KOLESNICK RN AND PALEY AE (1987) 1,2-Diacylglycerols and phorbol esters stimulate phosphatidylcholine metabolism in GH₃ pituitary cells. *J Biol Chem* 262: 9204-9210.

***KOLESNICK RN AND HEMER MR** (1990) Physiologic 1,2-diacylglycerol levels induce protein kinase C-independent translocation of a regulatory enzyme. *J Biol Chem* 265: 10900-10904.

***LACAL JC, DE LA PEÑA P, MOSCAT J, GARCIA-BARRENO P, ANDERSON PS AND AARONSON SA** (1987) Rapid stimulation of diacylglycerol production in *Xenopus* oocytes by microinjection of H-ras p21. *Science* 238: 533-536.

***LACAL JC, MOSCAT J AND AARONSON SA** (1987) Novel source of 1,2-diacylglycerol elevated in cells transformed by Ha-ras oncogene. *Nature* 330: 269-272.

***LACAL JC** (1990) Diacylglycerol production in *Xenopus laevis* oocytes microinjection of p21ras proteins is a consequence of activation of phosphatidylcholine metabolism. *Mol Cell Biol* 10: 333-340.

***LARSEN WJ, TUNG HN AND POLKING C** (1981) Response of granulosa cell gap junctions to human chorionic gonadotropin (hCG) at ovulation. *Biol Reprod* 25: 1119-1134.

***LASSEGUE B, ALEXANDER RW, CLARK M, AKERS M AND GRIENGLING KK** (1993) Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in

angiotensin II-stimulated vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 292: 509-517.

*LAVIE Y AND LISCOVITCH M (1990) *J Biol Chem* 265: 3868-3872.

LEACH KL, RUFF VA, WRIGHT TM, PESSIN MS AND RABEN DM (1991) Dissociation of protein kinase C activation and *sn*-1,2-diacylglycerol formation. *J Biol Chem* 266: 3215-3221.

*LINDMAR R, LÖFFELHOLZ K AND SANDMANN J (1988) *Biochem Pharmacol* 37: 4689-4695.

*LISCOVITH M, BLUSZTAJN JK, FREESE A AND WURTMAN RJ (1987) *Biochem J* 241: 81-86.

*LISCOVITCH M (1989) *J Biol Chem* 264: 1450-1456.

*LISCOVITCH M AND AMSTERDAM A (1989) Gonadotropin-releasing hormone activates phospholipase D in ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 264: 11762-11767.

*LOEXEN MR, CHANNING CP, DELETTO R AND WEISS G (1983) Stimulatory effect of luteinizing hormone upon relaxin secretion by cultured porcine preovulatory granulosa cells. *Endocrinology* 112: 769-783.

*LOFFELHOLZ K (1989) *Biochem Pharmacol* 38: 1543-1549.

*LOPEZ-BARAHONA M, KAPLAN PL, CORNET ME, DIAZ-MECO MT, LARRODERA P, DIAZ-LAVIADA I, MUNICIO AM AND MOSCAT J (1990) Kinetic evidence of a rapid activation of phosphatidylcholine hydrolysis by *Ki-ras* oncogene. *J Biol Chem* 265: 9022-9026.

Bibliografía

*MA F AND LEUNG CK (1985) Luteinizing hormone releasing hormone enhances polyphosphoinositide breakdown in rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 130: 1201-128.

*MADEJ E (1980) Effect of exogenous hormones on the activity of $^{5-3\beta}$ -hydroxysteroid dehydrogenase in cultured granulosa cells from proestrous and preovulatory rat ovarian follicles. *Acta Histochem* 67: 253-260.

*MARTIN TW AND MICHAELIS KC (1988) Bradykinin stimulates phosphodiesteratic cleavage of phosphatidylcholine in cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 1271-1279.

*MARTIN TW AND MICHAELIS KC (1989) P₂-purinergic agonists stimulate phosphodiesteratic cleavage of phosphatidylcholine in endothelial cells. Evidence for activation of phospholipase D. *J Biol Chem* 264: 8847-8856.

*MARTIN TW, FELDMAN DR AND MICHAELIS KC (1990) *Biochim Biophys Acta* 1053: 162-172.

*MARTINSON EA, GOLDSTEIN D AND BROWN JH (1989) Muscarinic receptor activation of phosphatidylcholine hydrolysis. *J Biol Chem* 264: 14748-14754.

*McMASTERS KM, DICKSON LA, ROBISCHON K, MACDONALD GF AND MOYLE WR (1987) Rat cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450 scc): Use of a cDNA probe to study the hormonal regulation of P-450scc mRNA levels in ovarian granulosa cells. *Gene* 57: 1-9.

*MATOZAKI T AND WILLIAMS JA (1989) *J Biol Chem* 264: 14729-14734.

Bibliografía

*MATOZAKI T, SAKAMOTO C, NISHISAKI H, SUZUKI T, WADA K, MATSUDA K, NAKANO O, KONDA Y, NAGAO M AND KASUGA M (1991) Cholecystokinin inhibits phosphatidylcholine synthesis via a Ca²⁺-calmodulin-dependent pathway in isolated rat pancreatic acini. A possible mechanism for diacylglycerol accumulation. *J Biol Chem* 266: 22246-22253.

*MAY JW, McCARTY K Jr, REICHERT LE AND SCHOMBERG DW (1980) Follicle-stimulating hormone-mediated induction of functional luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors during monolayer culture of porcine granulosa cells. *Endocrinology* 107: 1041-1049.

*MINNICOZZI M, ANTHES JC, SIEGEL MI, BILLAH MM AND EGAN RW (1990) *Biochim Biophys Res Commun* 170: 540-547.

*MOCK T, SLATERTL, ARTHUR G, CHAN AC AND CHOY PC (1986) *Biochem Cell Biol* 64: 413-420.

*MOON YS, DULEBA AJ, KIM KS AND HO YUEN B (1985) Alterations of α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in cultured rat granulosa cells by follicle-stimulating hormone and testosterone. *Biol Reprod* 32: 998-1009.

*MUIR JG AND MURRAY AW (1987) *J Cell Physiol* 130: 382-391

*MULLMANN TJ, SIEGEL MI, EGAN RW AND BILLAH MM (1990a) *J Immunol* 144: 1901-1908.

*MULLMANN TJ, SIEGEL MI, EGAN RW AND BILLAH MM (1990b) *Biochem Biophys Res Commun* 170: 1197-1202.

*MULLMANN TJ, SIEGEL MI, EGAN RW AND BILLAH MM (1991) *J Biol Chem* 266: 2013-2016.

*NAIR GP, STANDAERT ML, POLLET RJ, COOPER DR AND FARESE RV (1988) Effects of insulin and phorbol esters on diacylglycerol generation and synthesis and hydrolysis of phosphatidylcholine in BC3H-1 myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 1345-1349.

*NAOR Z AND YAVIN E (1982) Gonadotropin-releasing hormone stimulates phospholipid labeling in cultured granulosa cells. *Endocrinology* 111: 1615-1619.

NAKAZATO Y, SIMONSON MS, HERMAN WH, KONIECZKOWSKI M AND SEDOR JR (1991) Interleukin-1 α stimulates prostaglandin biosynthesis in serum-activated mesangial cells by induction of a non-pancreatic (Type II) phospholipase A₂. *J Biol Chem* 266: 14119-14127.

*NIMROD A (1981) The induction of ovarian LH-receptor by FSH is mediated by cyclic AMP. *FEBS Lett* 131: 31-33.

*PAI J-K, SIEGEL MI, EGAN RW AND BILLAH MM (1988) *J Biol Chem* 263: 12472-12477.

PARKS WA, COOPER CL AND LOW RL (1990) Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine enhance the activity of the mammalian mitochondrial endonuclease *in vitro*. *J Biol Chem* 265: 3436-3439.

*PELECH SL, PRITCHARD PH AND VANCE DE (1981) *J Biol Chem* 256: 8283-8286.

*PELECH SL AND VANCE DE (1982) Regulation of rat liver cytosolic CTP:

phosphocholine cytidyltransferase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 257: 14198-14202.

***PELECH SL, PRITCHARD PH, BRINDLEY DN AND VANCE DE (1983) *J Biol Chem* 258: 6782-6788.**

***PELECH SL, PRITCHARD PH, SOMMERMAN EF, PERCIVAL-SMITH A AND VANCE DE (1984) *Can J Biochem Cell Biol* 62: 196-202.**

***PELECH SL AND VANCE DE (1984) *Biochim Biophys Acta* 779: 217-251.**

***PELECH SL, COOK HW, PADDON HB AND VANCE DE (1984) *Biochim Biophys Acta* 795: 433-440.**

***PELECH SL AND VANCE DE (1989) Signal transduction via phosphatidylcholine cycles. *TIBS* 14: 28-30**

PENNYBACKER M AND HERMAN B (1991) Follicle-stimulating hormone increases c-fos mRNA levels in rat granulosa cells via protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Cell Endo* 80: 11-20.

***PETER-RIESCH B, FATHI M, SCHLEGEL W AND WOLLHEIM CB (1988) *J Clin Invest* 81: 1154-1161.**

***PETTITT TR AND WAKELAM JO (1993) Bombesin stimulates distinct time-dependent changes in the sn-1,2-diradylglycerol molecular species profile from Swiss 3T3 fibroblasts as analysed by 3,5-dinitrobenzoyl derivation and h.p.l.c. separation. *Biochem J* 289: 487-495.**

PITTNER RA AND FAIN JN (1992) Ethanol is a potent stimulator of phosphatidylcholine breakdown in cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1133: 316-320.

PLEVIN R AND WAKELAM MJO (1992) Rapid desensitization of vasopressin-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylcholine hydrolysis questions the role of these pathways in sustained diacylglycerol formation in A10 vascular-smooth-muscle cells. *Biochem J* 285: 759-766.

***POLVERINO AJ AND BARRITT GJ** (1988) On the source of the vasopressin-induced increases in diacylglycerol in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 970: 75-82.

PREISS JE, LOOMIS CR, BELL RM AND NIEDEL JE (1987) Quantitative measurement of *sn*-1,2- diacylglycerols. *Meth Enzymol* 141: 294-300.

***PRICE BD, MORRIS JDH, MARSHALL CJ AND HALL A** (1989) Stimulation of phosphatidylcholine hydrolysis, diacylglycerol release, and arachidonic acid production by oncogenic ras is a consequence of protein kinase C activation. *J Biol Chem* 264: 16638-16643.

***PRICE BD, MORRIS JD AND HALL A** (1989) Stimulation of phosphatidylcholine breakdown and diacylglycerol production by growth factors in Swiss-3T3 cells. *Biochem J* 264: 509-515.

***RANDALL RW, BONSER RW, THOMPSON NT AND GARLAND LG** (1990) *FEBS Lett* 264:87-90.

***RANTA T, KNECHT M, KODY M AND CATT KJ** (1982) GnRH receptors in cultured rat granulosa cells: mediation of the inhibitory and stimulatory actions of GnRH. *Mol Cell Endocrinol* 27: 233-240.

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

***RANTA T, KNECHT M, DARBON J-M, BAUKAL AJ AND CATT K (1984)** 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.

***RATNER A (1976)** Effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone upon cyclic AMP and GMP levels in rat cells. *Endocrinology* 112: 1382-1388.

***REINHOLD SL, PRESCOTT SM, ZIMMERMANN GA AND McINTYRE TM (1990)** *FASEB J* 4: 208-214.

***RICHARDS JS (1975)** Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development: Modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology* 97: 1174-1184.

***RICHARDS JS, IRELAND JT, RAO MC, BERNATH GA, MIGDLEY AR AND REICHERT LE Jr (1976)** Ovarian follicular development in the rat: Hormone receptor regulation by estradiol, follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology* 99: 1562-1570.

***RICHARDS JS (1980)** Maturation of ovarian follicles actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 60: 51-89.

***ROBINSON BS, YAO ZM, BAISTED DJ AND VANCE DE (1989)** Lysophosphatidylcholine metabolism and lipoprotein secretion by cultured rat hepatocytes deficient in choline. *Biochem J* 260: 207-214.

Bibliografía

- *RODERS RJ, WATERMAN MR AND SIMPSON (1986)** Cytochromes P-450_{sc} P-450_{17 α} adrenodoxin, and reduced nicotinamide dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase in bovine follicles and corpora lutea. Changes in specific contents during ovarian cycle. *Endocrinology* 118: 1366-1374.
- *ROONEY SA, SMART DA, WEINHOLD PA AND FELDMAN DA (1990)** Dexamethasone increases the activity but not the amount of choline-phosphate cytidyltransferase in fetal rat lung. *Biochim Biophys Acta* 1044: 385-389.
- *ROSOFF PM, SAVAGE N AND DINARELLO CA (1988)** Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell* 54: 73-81.
- *ROY SK AND GREENWALD GS (1991)** *Endocrinology* 129: 1903-
- *RUBIN R (1988)** *Biochim Biophys Res Commun* 156: 1090-1096.
- SAKANE F, YAMADA K, IMAI S AND KANO H (1991)** Porcine 80-kDa diacylglycerol kinase is a calcium-binding and calcium/phospholipid-dependent enzyme and undergoes calcium-dependent translocation. *J Biol Chem* 266: 7096-7100.
- SAMBORSKI RW, RIDGWAY ND AND VANCE DE (1990)** Evidence that only made phosphatidylethanolamine is methylated to phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamina is not significantly deacylated-reacylated in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 265: 18322-18329.
- *SANGHERA JS AND VANCE DE (1989)** *J Biol Chem* 264: 1215-1223.
- *SANGHERA JS AND VANCE DE (1989)** Stimulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase and phosphatidilcholine synthesis by calcium in rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1003:284-292.

Bibliografía

*SCHREIBER JR AND ROSS GT (1976) Further characterization of a rat ovarian testosterone receptor with evidence for nuclear translocation. *Endocrinology* 99: 590-596.

*SCHREY MP, READ AM AND STEER PJ (1987) *Biochem J* 246: 705-713.

*SHAW KJ, CAMPEAU JD, ROCHE PC AND DIZEREGA GS (1985) Porcine granulosa cell production of plasminogen activator: Disparity between the effects of hCG and FSH. *Clin Exp Endocrinol* 8: 26-34.

*SHINOHARA O, KNECHT M AND CATT KJ (1985) Inhibition of gonadotropin-induced granulosa cell differentiation by activation of protein kinase C. *Proc Nat Acad Sci USA* 82: 8518-8522.

*SLACK BE, BREU J AND WURTMAN RJ (1991) Production of diacylglycerol by exogenous phospholipase C stimulates CTP: phosphocholine cytidyltransferase activity and phosphatidylcholine synthesis in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 266: 24503-24508.

*SLEIGHT R AND KENT C (1983) *J Biol Chem* 258: 824-830.

*SLIVKA SR, MEIER KE AND INSEL PA (1988) Alpha 1-adrenergic receptors promote phosphatidylcholine hydrolysis in MDCK-D1 cells. A mechanism for rapid activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 263: 12242-12246.

*SUNDLER R AND AKESSON B (1975) *J Biol Chem* 250: 3359-3367.

*TAKUWA N, TAKUWA Y AND RASMUSSEN H (1987) *Biochem J* 243: 647-653.

*TEEGARDEN D, TAPAROWSKY EJ AND KENT C (1990) Altered phosphatidylcholine metabolites in C3H10T^{1/2} cells transfected with the harvey-ras oncogene. *J Biol Chem* 265:

6042-6047.

***TERCE F, RECORD M, RIBBES G, CHAP H AND DOUSTE-BLAZY L (1988)** Intracellular processing of cytidyltransferase in Krebs II cells during stimulation of phosphatidylcholine synthesis. Evidence that a plasma membrane modification promotes enzyme translocation specifically to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263: 3142-3149.

***TESSNER TG, ROCK CO, KALMAR GB, CORNELL RB AND JACKOWSKI S (1991)** Colony-stimulating factor 1 regulates CTP: phosphocholine cytidyltransferase mRNA levels. *J Biol Chem* 266: 16261-16264.

***THOMPSON NT, TATESON JE, RANDALL RW, SPACEY GD, BONSER RW AND GARLAND LG (1990)** *Biochem J* 271: 209-213.

TIJBURG LBM, NISHIMAKI-MOGAMI T AND VANCE DE (1991) Evidence that the rate of phosphatidylcholine catabolism is regulated in cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Act* 1085: 167-177.

TIJBURG LBM AND VANCE DE (1991) Head group specificity in the regulation of phosphatidylcholine catabolism in rat hepatocytes. *Biochim Biophys Act* 1085: 178-183.

***TOAFF ME, STRAUSS JF III AND HAMMOND JM (1983)** Regulation of cytochrome P-450_{sc} in immature porcine granulosa cells by FSH and stradiol. *Endocrinology* 112: 1156-1158.

***TONES MA, SHARIF NA AND HAWTHORNE JN (1988)** Phospholipid turnover during cell-cycle traverse in synchronous Chinese-hamster ovary cells. Mitogenesis without phosphoinositide breakdown. *Bochem J* 249: 51-56.

*TONETTA S AND DIZEREGA GS (1989) Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr Rev* 10: 205-229.

TRIGGIANI M, D'SOUZA DM AND CHILTON FH (1991) Metabolism of 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine in the human neutrophil. *J Biol Chem* 266: 6928-6935.

*TUOMINEN RK, WERNER MH, McMILLIAN MK, HUDSON PM, HANNUN YA AND HONG JS (1993) Biphasic generation of diacylglycerol by angiotensin and phorbol ester in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 181-185.

*UHING RJ, PRPIC V, HOLLENBACH PW AND ADAMS DO (1989) *J Biol Chem* 264: 9224-9230.

*UTAL AK, JAMIL H AND VANCE DE (1991) Diacylglycerol signals the translocation of CTP: choline-phosphate cytidyltransferase in HeLa cells treated with 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Biol Chem* 266: 24084-24091.

VAN BLITTERSWIJK WJ, HILKMANN H AND VAN DER BEND RL (1991) Phospholipid metabolism in bradykinin-stimulated human fibroblasts. I Biphasic formation of diacylglycerol from phosphatidylinositol and phosphatidylcholine, controlled by protein kinase C. *J Biol Chem* 266: 10337-10343.

VAN DER BEND RL, DE WIDT J, VAN CORVEN EJ, MOOLENAAR WH AND VAN BLITTERSWIJK WJ (1992) The biologically active phospholipid, lysophosphatidic acid, induces phosphatidylcholine breakdown in fibroblasts via activation of phospholipase D. *Biochem J* 285: 235-240.

*VANCE JE AND VANCE DE (1988) Does rat liver Golgi have the capacity to synthesize phospholipids for lipoprotein secretion? *J Biol Chem* 263: 5898-5909.

Bibliografía

VANCE JE (1990) Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem* 265: 7248-7256.

VANCE JE, PAN D, VANCE DE AND CAMPENOT RB (1991) Biosynthesis of membrane lipids in rat axons. *J Cell Biol* 115: 1061-1068.

VANCE DE AND BURKE DC (1974) Inhibition of 3-sn-phosphatidylcholine biosynthesis in Baby-hamster kidney- 21 cells infected with Semliki forest virus. *Eur J Biochem* 43: 327-336.

*VASKOVSKY VE KOSTETSKY EY AND VASENDIN IM (1975) A universal reagent for phospholipid analysis. *J Chromat* 114: 129-141.

*VELDHUIS JD, KLASE PA AND HAMMOND JM (1980) Divergent effects of prolactin upon steroidogenesis by porcine granulosa cells in vitro: Influence of cytodifferentiation. *Endocrinology* 107: 42-46.

*VELDHUIS JD AND KLASE PA (1982) Mechanisms by calcium ions regulate the steroidogenic actions of luteinizing hormone in isolated ovarian cells in vitro. *Endocrinology* 111: 1-6.

*VELDHUIS JD, KLASE PA, DEMERS LM AND CHAFOULEAS JG (1984) Mechanisms subserving calcium's modulation of luteinizing hormone action in isolated swine granulosa cells. *Endocrinology* 114: 441-449.

*VIDYASHANKAR N AND MOUGDAL NR (1984) Effect of pregnant mare serum gonadotropin on the induction and degradation of FSH and LH receptor in the granulosa cell of the immature rat. *Mol Cell Endocrinol* 37: 215-222.

Bibliografía

WALKER JM, HOMAN EC AND SANDO JJ (1990) Differential activation of protein kinase C isozymes by short chain phosphatidylserines and phosphatidylcholines. *J Biol Chem* 265: 8016-8021.

***WANG C, HSUEH AJW AND ERICKSON GF** (1979) Induction of functional prolactin receptors by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells *in vivo and in vitro*. *J Biol Chem* 254: 11330-11336.

***WANG C, HSUEH AJW AND ERICKSON GF** (1980) Prolactin inhibition of estrogen production by cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 20: 135-144.

***WANG C AND CHAN V** (1982) Divergent effects of prolactin on estrogen and progesterone production by granulosa cells of rat graafin follicles. *Endocrinology* 110: 1085-1093.

***WANG C, HSUEH AJW AND ERICKSON GF** (1982) The role of cyclic AMP in the induction of estrogen and progestin synthesis in cultured granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 25: 73-83.

***WANG C** (1983) Luteinizing hormone releasing hormone stimulates plasminogen activator production by rat granulosa cells. *Endocrinology* 112:1130-1132.

***WANG Y, MACDONALD JIS AND KENT C** (1993) Regulation of CTP: cytidyltransferase in Hela cells. Effect of oleate on phosphorylation and intracellular localization. *J Biol Chem* 268: 5512-5518.

WATKINS JD AND KENT C (1990) Phosphorylation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase *in vivo*. *J Biol Chem* 265: 2190-2197.

WEINHOLD PA AND RETHY VB (1974) The separation, purification and characterization of ethanolamine kinase and choline kinase from rat liver. *Biochemistry* 13: 5135-5141.

***WEINHOLD PA, ROUNSIFER ME, WILLIAMS SE, BRUBAKER PG AND FELMAN DA (1984)** *J Biol Chem* 259: 10315-10321.

WEINHOLD PA, ROUNSIFER ME AND FELMAN DA (1986) The purification and characterization of CTP: phosphorylcholine cytidyltransferase from rat liver. *J Biol Chem* 261: 5104-5110.

***WELSH TH, JONES PBC AND HSUEH AJW (1984)** Phorbol ester inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis in vitro. *Cancer Res* 44: 885-891.

***WELSH TH, JIA X-CH AND HSUEH AJW (1984)** Forskolin and phosphodiesterase inhibitors stimulate rat granulosa cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 37: 51-60.

***WELSH CJ, CAO HT, CHABBOTT H AND CABOT MC (1988)** Vasopressin is the only component of serum-free medium that stimulates phosphatidylcholine hydrolysis and accumulation of diacylglycerol in cultured REF52 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 152: 565-572.

WIEDER T, GEILEN CC AND REUTTER W (1993) Antagonism of phorbol-ester-stimulated phosphatidylcholine biosynthesis by the phospholipid analogue hexadecylphosphocholine. *Biochem J* 291: 561-567.

WONG B, TANG W AND ZIBOH V (1992) Identification of a membrane-associated 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine hydrolyzing phospholipase A₂ in guinea pig 1 epidermis. *FEBS* 305: 213-216.

***WOLF BA, EASOM RA, HUGHES JH, MCDANIEL ML AND TURK J (1989)** *Biochemistry* 28: 4291-4301.

***WOLFMAN A AND MACARA IG (1987)** Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester sensitivity in *ras*-transformed fibroblasts. *Nature* 325: 359-361.

***WRIGHT TM, RANGAN LA, SHIN HS AND RABEN DM (1988)** Sustained increase in 1,2-diacylglycerol precedes DAN synthesis in epidermal-growth-factor-stimulated fibroblast. *J Biol Chem* 263:9374-9380.

WYKE AW, COOK S, MACNULTY EE AND WAKELAM MJO (1992) v-Src induces elevated levels of diglyceride by stimulation of phosphatidylcholine hydrolysis. *Cell Signall* 4: 267-274.

YAMADA K, KANAHO Y, MIURA K AND NOZAWA Y (1991) Antigen-induced phospholipase D activation in rat mast cells is independent of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 175: 159-164.

YANG J AND TASHJIAN AHJR (1991) Platelet-activating factor affects cytosolic free calcium concentration and prolactin secretion in GH₄C₁ rat pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 424-431.

***YAO Z AND VANCE DE (1988)** The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem* 263: 2998-3004.

***YAO Z AND VANCE DE (1989)** Head group specificity in the requirement of phosphatidylcholine biosynthesis for very low density lipoprotein secretion from cultured hepatocytes. *J Biol Chem* 264: 11373-11380.

Bibliografía

***YAO Z, JAMIL H AND VANCE DE (1990)** Choline deficiency causes translocation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase from cytosol to endoplasmic reticulum in rat liver. *J Biol Chem* 265: 4326-4331.

***YAVIN E (1976)** Regulation of phospholipid metabolism in differentiating cells from rat brain cerebral hemispheres in culture. *J Biol Chem* 251: 1392-1397.

LABOR INVESTIGADORA REALIZADA POR LA CANDIDATA DURANTE SUS ESTUDIOS DE TERCER CICLO

1.- CREDITOS

2.- COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

3.- PUBLICACIONES CIENTIFICAS

1. CREDITOS

1.1 Curso académico 1990-1991:

Técnicas radioisotópicas en Endocrinología. 1 crédito.

Separación de productos biológicos y metabolitos y técnicas cuantitativas. 3 créditos.

Mecanismos de acción de hormonas esteroideas. 3 créditos

Hormonas acopladas al sistema AMPc-PKA. 3 créditos.

Los fosfolípidos de membrana como mensajeros intracelulares. 3 créditos.

Técnicas histoquímicas e inmunohistoquímica. 1 crédito.

1.2 Curso académico 1991-1992:

Cultivos celulares. 1 crédito.

La Biología Molecular aplicada al conocimiento de los Mecanismos de Acción Hormonal.
3 créditos.

La estructura de moléculas y macromoléculas implicadas en la transmisión de la señal hormonal. 2 créditos.

Mecanismos de proliferación y diferenciación celular. 2 créditos.

Detección de proteínas celulares por inmunocitoquímica. 1 crédito.

1.3 Publicaciones. 9 créditos

TOTAL CREDITOS: 32

2. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Evidencias inmunocitoquímica de la presencia de desmina en las cortezas ciliadas de oviducto de gallina.

Bautista Harris G., Ojeda Vargas L., Santana Delgado P.

III Congreso Sociedad Española de Biología Celular.

Leioa, España, 11-15 Diciembre 1989.

Síndrome de Richner-Hanhart (Tirosinemia tipo II).

Jiménez Acosta F., Ponce I., Santana P., Benítez L., Quintana J., González J.

XX Congreso Nacional de Dermatología y Venereología.

Las Palmas de Gran Canaria, España, 30, 31 de Mayo y 1 de Junio de 1991.

Diacylglycerol but not calcium mediates LHRH inhibitory effects on ovarian granulosa cell function.

P. Santana, J. Quintana, J. González, L. Benítez, C.M. Ruiz de Galarreta and L.F. Fanjul.

15th International Congress of Biochemistry.

Jerusalem, Israel, 4-8 de Agosto de 1991.

Glycosylphosphatidylinositol: A candidate system for prolactin signal transduction in ovarian granulosa cells.

J. González, J. Quintana, P. Santana, L. Benítez, L.F. Fanjul and C.M. Ruiz de Galarreta.

15th International Congress of Biochemistry.

Jerusalem, Israel, 4-8 de Agosto de 1991.

Activación de la hidrólisis de fosfatidilcolina en respuesta a LHRH en célula granulosa.

P. Santana, I. Hernández, J. Cabrera, J. González, F. Estévez y L.F. Fanjul.

XXV Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas.

Córdoba 13-17 Septiembre 1992.

Participación de las fosfatasas en la regulación de la esteroidogénesis en célula granulosa ovárica mantenida en cultivo primario.

J. González, P. Santana, I. Hernández, F. Estévez, C.M. Ruiz de Galarreta.

XXV Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas.

Córdoba 13-17 Septiembre 1992

3.- PUBLICACIONES

Lorenzo A., **Santana P.**, Gómez T. and Badía P.

Sodium and Chloride Transport in the Lizard Duodenum. **Zoological Science** **6**: 667-674 (1989).

L.F. Fanjul, J. Quintana, J. González, **P. Santana**, F. Estévez and C.M. Ruiz de Galarreta.

Testicular 3 β - hydroxysteroid dehydrogenase/ ⁵⁻⁴ isomerase in the hypophysectomized rat: effect of treatment with 5 α -dihydrotestosterone. **Journal of Endocrinology** **133**: 237-243 (1992).

L.F. Fanjul, J. González, **P. Santana**, F. Estévez, J. Quintana and C.M. Ruiz de Galarreta.

R5020 Enhances PGE₂ stimulated steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. **Revista Española de Fisiología** **48**(3), 167-170 (1992).

L.F. Fanjul, A. Déniz, J. Quintana, **P. Santana**, J. González, F. Estévez and C.M. Ruiz de Galarreta.

Diacylglycerol rather than Ca²⁺ mediates GnRH inhibition of FSH induced steroidogenesis in ovarian granulosa cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. **188**: 198-204 (1992)

L.F. Fanjul, I. Marrero, F. Estévez, J. González, J. Quintana, **P. Santana** and C.M. Ruiz de Galarreta.

Follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotropin induced changes in granulosa cell glycosyl-phosphatidylinositol concentration. **Journal of Cellular Physiology**. **155**: 273-281 (1993)

L.F. Fanjul, I. Marrero, J. González, J. Quintana, **P. Santana**, F. Estévez, J.M. Matos and C.M. Ruiz de Galarreta.

Does glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis mediate prolactin signal transduction in granulosa cells ?. **European Journal of Biochemistry** (en prensa).

L.F. Fanjul, I. Hernández, **P. Santana**, J. González, J. Quintana, F. Estévez and C.M. Ruiz de Galarreta.

A factor in spent media from adult androgen treated testicular cells inhibits steroidogenesis in neonatal Leydig cells. **Journal of Andrology** (en prensa).

Sodium and Chloride Transport in the Lizard Duodenum

ANTHONIO LORENZO¹, PINO SANTANA, TOMAS GÓMEZ and PILAR BADIA

*Laboratorio de Fisiología Animal, Departamento de Biología Animal,
Facultad de Biología, Universidad de La Laguna, Tenerife, España*

ABSTRACT—The mechanisms by which Na and Cl ions are transported across the duodenal epithelium of the lizard *Gallotia galloti* were studied under voltage-clamped conditions. The lizard duodenum actively absorbed sodium and chloride with a ratio of approximately 2:1. In the absence of sodium, the short-circuit current (Isc) and net chloride flux (J_{net}^{Cl}) were abolished. In the absence of chloride, the net sodium flux (J_{net}^{Na}) was halved but the short-circuit current (Isc) was not changed significantly. Treatment with acetazolamide, amiloride, or disulfonic stilbene (DIDS) abolished the net chloride flux almost completely, whereas the Isc was not changed significantly. When ouabain was added to the serosal side, the short-circuit current and net fluxes of sodium and chloride were abolished. From an analysis of the effects of these inhibitors, a plausible model was developed to explain the characteristics of the sodium and chloride transport. It is proposed that the entry of sodium into the cell across the luminal membrane occurs via two pathways. A part of the Na⁺ entry occurs through the Na⁺/H⁺ antiporter and a part through an electrogenic pathway. The entry of Cl⁻ across the apical membrane occurs through the Cl⁻/HCO₃⁻ antiport. Chloride seems to exit the cell by a diffusional process.

INTRODUCTION

Electrolyte transport across leaky epithelia such as the gallbladder, renal proximal tubule and small intestine has been studied extensively *in vivo* and *in vitro* by measuring electrical parameters and tracer fluxes [1-3]. Numerous studies have demonstrated an interdependence of net transepithelial Na⁺ and Cl⁻ fluxes [4-7]. These results have been interpreted by the existence of direct coupling of Na⁺ and Cl⁻ fluxes through a ternary-complex of Na⁺ and Cl⁻, and cotransporter at the apical membrane [2]. However, the other possibility of neutral, coupled NaCl transport resulting from the simultaneous operation of Na⁺/H⁺ and Cl⁻/OH⁻ exchanges has been suggested [8-10]. These transport mechanisms have been studied specially in the small intestine of mammals and few references are found in reptilian intestine, where electrolyte transport has been studied especially in

the colon. Studies of the proximal and distal colon of *Testudo graeca* [11] have demonstrated that sodium and chloride are transported at a similar rate. Active transport of sodium and chloride ions has also been shown across the isolated turtle colon [12], lizard colon [13], and ileum [14].

The purpose of the present study was to investigate mechanisms of Cl⁻ and Na⁺ transport across isolated lizard duodenum by measuring unidirectional sodium and chloride fluxes in presence of several inhibitors. The results suggest that about 50% of apical sodium entry results from amiloride sensitive Na⁺/H⁺ exchange and that of the other 50% of the sodium uptake is electrogenic. The entry of chloride into the cell across the luminal membrane results from a Cl⁻/HCO₃⁻ exchange.

MATERIALS AND METHODS

Animals and preparation

Experiments were performed on male and female *Gallotia galloti* lizards (mean body weight

Accepted November 21, 1988

Received July 12, 1988

¹ To whom reprint requests should be addressed.

Testicular 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^{5-4} isomerase in the hypophysectomized rat: effect of treatment with 5α -dihydrotestosterone

L. F. Fanjul, J. Quintana, J. González, P. Santana, F. Estévez and C. M. Ruiz de Galarreta

Departamento de Endocrinología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Apdo 550, 35080 Las Palmas, Spain

(Requests for offprints should be addressed to C. M. Ruiz de Galarreta)

REVISED MANUSCRIPT RECEIVED 28 October 1991

ABSTRACT

The in-vivo regulatory effect of androgens on steroidogenesis was investigated. Adult (2 to 3 months old) hypophysectomized rats were treated intratesticularly with increasing doses of 5α -dihydrotestosterone (DHT; 10–200 $\mu\text{g}/100$ g body weight) or vehicle (50 μl dimethyl sulphoxide; DMSO) in the contralateral testis. Intratesticular testosterone concentrations were extremely low in hypophysectomized rats 15–20 days after surgery. Treatment with DHT caused a dose-dependent inhibition of testicular 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^{5-4} isomerase (3β -HSD) 2 h later, and this effect was apparent at the dose of 20 $\mu\text{g}/100$ g body weight ($P < 0.01$). The inhibitory effect of 3β -HSD was not due to a possible interference of DHT in the enzyme assay, since various concentrations of the

androgen (0.1–100 $\mu\text{mol}/\text{l}$) were ineffective as inhibitors of 3β -HSD. The highest dose of DHT used in this study (200 $\mu\text{g}/100$ g body weight) resulted in a rapid (1–2 h) and transient (4–6 h) inhibition (approximately 80%) of 3β -HSD activity. Pretreatment of rats with the antiandrogen cyproterone acetate (5 mg/rat) or the protein synthesis inhibitor cycloheximide (10 mg/rat) did not affect the enzyme activity of testes injected with DMSO, but counteracted the inhibitory effect of DHT on 3β -HSD activity in the contralateral testis. The results presented suggest that the inhibitory effect of the non-aromatizable androgen DHT is receptor-mediated and involves the synthesis of a factor(s) that modulates 3β -HSD activity.

Journal of Endocrinology (1992) **133**, 237–243

INTRODUCTION

Leydig cells are the primary site for testosterone synthesis within the mammalian testis (Ewing & Zirkin, 1983; Tähkä, 1986). Although there is little doubt about the important role of pulsatile-secreted luteinizing hormone (LH) in the regulation of Leydig cell steroidogenesis, locally produced growth factors (Tsutsumi, Kurachi & Oka, 1986; Casella, Smith, Van Wyck *et al.* 1987) and neuropeptides (Bhasin, Heber, Peterson & Swerdloff, 1983; Pintar, Schachter, Herman *et al.* 1984; Berry & Hirsh-Pescovitz, 1988; Yoon, Sklar & David, 1988; Audhya, Hollander, Schlessinger & Hutchinson, 1989) are thought to modulate testicular androgen biosynthesis. In addition, testicular oestrogens (Hsueh, Dufau & Catt, 1978; Nozu, Dehejia, Zawistowich *et al.* 1981; Brinkmann, Leemborg, Rommerts & Van der Molen, 1982; Abney & Keel,

1986) and androgens (Purvis & Hansson, 1978; Purvis, Clause & Hansson, 1979; Adashi & Hsueh, 1981; Ruiz de Galarreta, Fanjul, Meidan & Hsueh, 1983; Hales, Shah & Payne, 1987; Fanjul, Estévez, Déniz *et al.* 1989) can regulate testosterone biosynthesis by processes mediated through different receptors and at different steps along the steroidogenic pathway (Tähkä, 1986; Dufau, 1988).

Although the inhibitory effect of oestrogens on testicular steroidogenesis in the intact animal is well documented (Hsueh *et al.* 1978; Nozu *et al.* 1981; Brinkmann *et al.* 1982; Abney & Keel, 1986), no direct evidence for such mechanism(s) operating under in-vivo conditions has been reported for androgens (Purvis, Calandra, Haug & Hansson, 1977; Dalterio, Bartke, Brodie & Mayfield, 1983).

In the present study evidence is presented to indicate that in the adult hypophysectomized male rat

R5020 Enhances PGE₂ Stimulated Steroidogenesis in Cultured Rat Granulosa Cells

L. F. Fanjul, J. González, P. Santana, F. Estévez, J. Quintana
and C. M. Ruiz de Galarreta*

Departamento de Endocrinología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud
Universidad de Las Palmas de G.C.
35086 Las Palmas (Spain)

(Received on February 24, 1992)

L. F. FANJUL, J. GONZÁLEZ, P. SANTANA, F. ESTÉVEZ, J. QUINTANA
and C. M. RUIZ DE GALARRETA. *R5020 Enhances PGE₂ Stimulated Steroidogenesis in Cultured Rat Granulosa Cells*. *Rev. esp. Fisiol.*, 48 (3), 167-170, 1992.

Progesterone biosynthesis and metabolism to 20 α -hydroxyprogesterone was stimulated in granulosa cells cultured in the presence of 20 ng/ml of follicle stimulating hormone (FSH) or increasing concentrations of PGE₂ (10⁻⁹-10⁻⁷ M). Concurrent treatment with the synthetic progestin R5020 (10⁻⁶ M) enhanced the FSH or PGE₂ stimulated progesterone and 20 α -hydroxyprogesterone accumulation in culture media, as well as Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in granulosa cell homogenates. These findings may represent another example of an autocrine control mechanism in which the steroidogenic product of the granulosa cell exerts an ultra-short loop regulation of its own production.

Key words: Prostaglandins, R5020, Steroidogenesis, Granulosa cells.

Maturation of ovarian follicles results to a great extent from the FSH induced differentiation of granulosa cells. After binding to specific receptors in the granulosa cell membrane, FSH induces intracellular cAMP accumulation, increases membrane luteinizing hormone (LH) and prolactin receptor content and stimulates the secretion of estrogens, progestins and other non steroidal secretory products, impor-

tant for optimal folliculogenesis and oocyte maturation (2, 5, 17).

Ovarian prostaglandin synthesis (F and E series) is stimulated by gonadotropins, and its concentration increases in the follicular fluid of several species as ovulation approaches (1, 6, 9, 18). Early studies based on the ability of prostaglandin synthesis inhibitors to prevent ovulation, suggested a role for these molecules as regulators of ovarian function (4, 10, 11). An explanation of the possible mechanism of prostaglandin regulation of follicle rup-

* To whom all correspondence should be addressed.

**DIACYLGLYCEROL RATHER THAN Ca^{2+} MEDIATES GnRH INHIBITION OF
FSH INDUCED STEROIDOGENESIS IN OVARIAN GRANULOSA CELLS**

**Luisa F. Fanjul, Antonio Déniz, José Quintana, Pino Santana, Juan Gonzalez,
Francisco Estevez and Carlos M. Ruiz de Galarreta¹**

Departamento de Endocrinología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad
de Las Palmas de Gran Canaria, 35086, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

Received August 10, 1992

SUMMARY: Treatment of cultured granulosa cells with PLC or GnRH stimulated the rapid generation of DAG and phosphoinositide turnover. The PKC activators PLC (3 mU/ml) and TPA ($10^{-7}M$) or the decapeptide GnRH ($10^{-6}M$) elicited similar inhibitory responses on FSH or cAMP stimulated granulosa cell steroidogenesis. Mobilization of intracellular Ca^{2+} with A23187 ($10^{-8}M$) was followed by a slight increase in the steroidogenic activity of cultured granulosa cells, whereas elevation of extracellular K^+ (50 mM) largely augmented the steroid biosynthetic activity of the granulosa cells. These results suggest that the inhibitory effect of GnRH on granulosa cell steroidogenesis is mediated by generation of DAG, rather than by increases in intracellular Ca^{2+} concentrations. © 1992 Academic Press, Inc.

Interaction of FSH with its plasma membrane receptor on granulosa cell generates an increase in intracellular cAMP which elicits the activation of steroidogenic enzymes and the expression of peptide hormone receptors (reviewed in Refs. 1,2). These biochemical events elicited by the gonadotropin are accompanied by morphological changes of the immature cell and its transformation into its fully mature counterpart. After binding to specific receptors on granulosa cell membranes (3,4) the decapeptide GnRH can exert stimulatory (5,6) or inhibitory (7-9) control of the differentiation process, depending on the duration of GnRH treatment or the presence of other endocrine, paracrine or autocrine regulatory ligands (reviewed in Refs. 10,11). In the presence of FSH, GnRH prevents gonadotropin-stimulated granulosa cell steroidogenesis, and receptor expression processes (6,7) but the intracellular mechanism(s) whereby the decapeptide inhibits granulosa cell function are not completely

¹To whom correspondence should be addressed at DECYM, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, School of Medicine, Apdo. 550, Las Palmas 35086, Spain.

Abbreviations: GnRH, gonadotropin-releasing hormone; FSH, Follicle stimulating hormone; DAG, diacylglycerol; PLC, phospholipase C; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; PKC, protein kinase C; 3 β -HSD, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase / Δ^{5-4} isomerase.

Follicle-Stimulating Hormone and Human Chorionic Gonadotropin Induced Changes in Granulosa Cell Glycosyl-Phosphatidylinositol Concentration

LUISA F. FANJUL, ISABEL MARRERO, F. ESTEVEZ, J. GONZALEZ, J. QUINTANA, PINO SANTANA, AND C.M. RUIZ DE GALARRETA*

Departamento de Endocrinología Celular y Molecular, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35080 Las Palmas, Spain

In the present investigation, a hCG sensitive glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) was isolated from cultured rat granulosa cells obtained from the ovaries of diethylstilbestrol (DES) implanted immature rats. The inositol-phosphoglycan (IPG) moiety of the GPI-lipid contains galactose, glucosamine, and myoinositol as demonstrated by metabolic labelling of granulosa cells for different time periods (5–96 h) with [³H]galactose, [³H]glucosamine, or [³H]myoinositol and treatment of the purified [³H]GPI with phosphatidylinositol-specific phospholipase C. Labelling equilibrium of the GPI-lipid was achieved after 24 h ([³H]galactose and [³H]myoinositol) or 72 h ([³H]glucosamine) incubation, whereas incorporation of other labelled carbohydrates tested ([³H]galactosamine, [³H]mannose, and [³H]sorbitol) was negligible throughout the time period studied. The glucosamine C-1 appears to be linked through a glycosidic bond to the myoinositol molecule of the IPG moiety as revealed by the generation of phosphatidylinositol (PtdIns) after nitrous acid deamination of dual labelled ([³H]glucosamine/[¹⁴C]palmitate or [³H]glucosamine/[¹⁴C]myristate) glycosyl-phosphatidylinositol. To investigate the fatty acid composition of the diacylglycerol (DAG) backbone of the GPI, granulosa cells were also labelled (5–72 hr) with [¹⁴C]linoleate, [³H]myristate, [³H]oleate, [³H]palmitate, or [³H]stearate and the radioactivity associated with the purified glycosyl-phosphatidylinositol determined. Incorporation of [³H]palmitate and [³H]myristate into the GPI-lipid peaked after 8 h and 24 h of labelling, respectively, and both fatty acids were partially released after PLA₂ treatment of the dual labelled ([³H]glucosamine/[¹⁴C]palmitate or [³H]glucosamine/[¹⁴C]myristate) GPI. In parallel experiments no significant incorporation of labelled stearate, oleate, or linoleic acid into the DAG backbone of the glycosyl-phosphatidylinositol could be detected. Granulosa cells were also labelled with [³H]glucosamine in the presence of FSH (30 ng/ml), cholera toxin (1 μg/ml), or the membrane permeable cAMP analog (but)₂cAMP (1 mM). Time related increases in GPI-labelling were apparent after 48 h and reached a maximum level (3-, 5-, and 7-fold for FSH, CT, and (but)₂cAMP, respectively) after 72 h in culture. In another set of experiments, granulosa cells were labelled for 72 h with [³H]glucosamine in the presence of (but)₂cAMP (1 mM), TPA (10⁻⁷ M), or combination thereof. The effect of treatment with the membrane permeable cAMP analog on GPI labelling was prevented in the presence of TPA, whereas no differences in [³H]GPI content could be observed in untreated granulosa cells or cells cultured in the presence of the protein kinase C-activating phorbol ester alone. In cells differentiated with FSH (30 ng/ml for 3 days) to induce LH receptors, treatment with hCG (100 ng/ml) induced a rapid (60 sec) and transient (5 min) decrease in the GPI content, whereas no effect of the hormone on undifferentiated granulosa cells could be observed. The rapid effect elicited by hCG on GPI content and turnover may be an early transduction mechanism involved in the biological effects of LH/hCG in differentiated granulosa cells. © 1993 Wiley-Liss, Inc.

Proliferation and differentiation of ovarian granulosa cells are initiated by FSH binding to specific membrane receptors with subsequent stimulation of adenylate cyclase activity, followed by increases in

Received March 31, 1992; accepted September 9, 1992.

*To whom reprint requests/correspondence should be addressed.

European Journal of Biochemistry

Zürich, 17/06/93

Dr. C. M. Ruiz de Galarreta
Depto. de Endocrinología Celular
y Molecular
Univ. de las Palmas de Gran Canaria
Apartado 550
35080 LAS PALMAS
Canary Islands

Reference no.: 93-0523

Does glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis mediate prolactin signal transduction in granulosa cell?

by

Fanjul Luisa F.,
Marrero Isabel, González Juan, Quintana José, Santana Pino, Estévez Francisco, Mato Jose María, Ruiz de Galarreta Carlos M. Ruiz

Editor: Girard

Dear Dr. Ruiz de Galarreta,

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the Journal. It is being copy-edited and will be forwarded to the publisher. You may expect to receive the proofs for correction in 4-6 weeks.

Yours sincerely,



pp. Dr. Julia Maillou
Editorial manager

Copy: Editor

.....

.....

Journal of ANDROLOGY

Official Publication of the American Society of Andrology
June 17, 1993

Co-Editors-in-Chief
Donald J. Tindall • Ronald W. Lewis

Editorial Assistant
Denise Lecy

Ms. Ref. No. 93-00022 (Revision 1)

Tentatively scheduled for: Nov./Dec. 1993

Dr. Carlos M. Ruiz de Galarreta
Departamento de Endocrinología Celular y Molecular
Facultad de Medicina
Universidad de Las Palmas
APDO 550
35080 Las Palmas, SPAIN

Dear Doctor Ruiz de Galarreta:

It is a pleasure to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the *Journal of Andrology*. Page proofs should reach you within four to six weeks of this acceptance date. If your address changes, please notify us immediately.

We would like to call your particular attention to the following:

1. When page proofs are received, please read, correct, and return them to the Managing Editor (along with the complete original typescript) within 72 hours. Proofs should be returned by the fastest mail service available. If proofs are not returned on time, the article will be published without the authors' corrections.
2. Changes in proofs entail considerable expense and publication delay and thus are discouraged unless absolutely necessary.
3. When reading proofs, please answer carefully all of the copy editor's queries, and pay particular attention to the illustrations to ensure the quality and accuracy of their reproduction.
4. Please read the entire manuscript carefully to verify that no changes in meaning have been introduced through copy editing.
5. Retain a copy of your corrected proof in the event that the original is lost or delayed in the mail.

We would also invite you to submit high-quality, color photographs pertaining to your manuscript which may serve as a cover illustration for our journal. Photos may be formatted horizontally or vertically with 5 x 7 inch dimensions. Please include a caption for your figure. Thank you in advance for your cooperation.

Sincerely yours,



Donald J. Tindall, Ph.D.
Co-Editor-in-Chief

DJT:drl

Editorial Office

Department of Urology Research • Guggenheim 1711 • Mayo Clinic • 200 First Street SW • Rochester, MN 55905
Tel: 507-284-2423 • Fax: 507-284-2384 • E-mail: ASA@MAYO.EDU