

## Tesis de Posgrado

# Acción de la insulina en la regulación de la actividad esteroideogénica en células luteales

Stein, Paula

1994

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Stein, Paula. (1994). Acción de la insulina en la regulación de la actividad esteroideogénica en células luteales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2674\\_Stein.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2674_Stein.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Stein, Paula. "Acción de la insulina en la regulación de la actividad esteroideogénica en células luteales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2674\\_Stein.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2674_Stein.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ACCION DE LA INSULINA EN LA REGULACION DE LA  
ACTIVIDAD ESTEROIDOGENICA EN CELULAS  
LUTEALES**

**Lic. Paula Stein**

**Directora: Dra. Marta Tesone**

**Tesis presentada para optar al título de  
Doctora en Ciencias Químicas**

**1994**

*F. Stein  
26/74  
Ej. 2*

**INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL**

*A mis padres*

# FGE y N BIBLIOTECA

Lo más hermoso de la vida es lo insondable, lo que está lleno de misterio. Es éste el sentimiento básico que se halla junto a la cuna del arte verdadero y de la auténtica ciencia. Quien no lo experimenta, el que no está en condiciones de admirar o asombrarse, está muerto, por decirlo así, y con la mirada apagada.

*Albert Einstein*

## **Agradecimientos**

A la Dra. Marta Tesone, por todas sus enseñanzas, por su infinita paciencia, por estar siempre que la necesité, por su constante apoyo, por el excelente clima de trabajo que se respira en el laboratorio y, por sobre todas las cosas, por su excepcional calidad humana.

Al Dr. Eduardo H. Charreau, por su asesoramiento, sus sugerencias y sabios consejos y por su calidez.

A la Dra. María Teresa Téllez-Iñón, por sus enseñanzas y su colaboración en las determinaciones de fosfodiesterasa.

Al Dr. Leonardo Bussmann, por sus infinitas respuestas a mis infinitas preguntas, por su generosidad sin límites, su permanente colaboración y por el orgullo de ser su preferida.

A los Dres. Lino Baraño, Patricia Cuasnicú, Jorge Tezón y Omar Pignataro por su colaboración y cordialidad.

A mis compañeros de laboratorio:

Liliana Dain, por las discusiones enriquecedoras, las largas horas de charla acerca de nuestras dudas existenciales, por sus enseñanzas y por haberme ayudado a soltar algunas cositas.

Hernán Guerrero, por su colaboración desinteresada, su enorme compañerismo, su ayuda salvadora ante cada problema de computación y por el paddle y los mates compartidos.

Alejandro Krimer, por sus enseñanzas para dar mis primeros pasos en la investigación.

Miguel Verbitsky y Carlos Buscaglia, por las horas compartidas en el laboratorio y fuera de él.

Quiero agradecer especialmente a:

Patricia Miranda, por su paciencia para responder a mis frecuentes consultas y por todo lo que compartimos en el viaje.

Débora Cohen, por ser una excelente compañera de muchísimos momentos compartidos.

Patricia Saragüeta, por su despiste, su alegría y por lo bien que la pasamos cuando viajamos juntas.

Silvina Pérez Martínez, por los partidos, los mates y muchas horas de convivencia en el Instituto.

Patricia Delcourt, por sus permanentes ganas de intentar cosas nuevas y por ser una madre.

Andrés Lemoine, por sus constantes bromas, que debo reconocer que ayudan.

Adriano Brandelli, por las caipirinhas, el paddle y tantos buenos momentos.

Guillermo Lanuza, porque él también es muy bueno.

Jefferson Cunha, por su empuje, su buen humor y su compañía imprescindibles en la recta final.

A todos ellos, además, agradezco por haber tenido la oportunidad de compartir tantos buenos momentos, por su apoyo imprescindible para terminar esta tesis, por su estímulo permanente, su ayuda generosa y, principalmente, por su amistad.

A Silvia Lugo, Alejandro Colman Lerner, Daniela Conesa, Horacio Daud, Fabiana Guerra, Esteban Vladusic, Pablo Visconti, Leonora Rochwerger y Silvia Porello, por haber sido excelentes compañeros en todos estos años.

A la Asociación de Amigos de Becarios Doctorales Desesperados, por su espontánea y tan necesaria colaboración.

A Ricardo Damnoti y Marcelo Lamamí por su colaboración con los gráficos y fotos.

A los miembros del IBYME en general, por el clima de respeto y colaboración en el que se trabaja.

Por último, a mis padres y mi hermana, por todo su amor, por su incesante estímulo, su constante disposición para colaborar y por haberme apoyado durante todos estos años, difíciles y hermosos.

## ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMP	adenosin monofosfato
AMPc	adenosin 3',5'-monofosfato cíclico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosin trifosfato
Ci	curie
CoA	coenzima A
cpm	cuentas por minuto
Da	Daltons
DEAE	dietilaminoetil
DHT	dihidrotestosterona
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
EGF	factor de crecimiento epidermal
FSH	hormona folículo-estimulante
GDP	guanosin difosfato
GnRH	hormona liberadora de gonadotrofinas
GTP	guanosin trifosfato
hCG	gonadotrofina coriónica humana
hLH	hormona luteinizante humana
h / hs	hora / horas
IGF-I	factor de crecimiento semejante a la insulina de tipo I
IgG	inmunoglobulina G



iv	intravenosa
KDa	kilodaltons
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis-Menten
LH	hormona luteinizante
mA	miliamperes
min	minutos
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
p/v	peso en volumen
PBS	buffer fosfato salino
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMSG	gonadotrofina de suero de yegua preñada
PRL	prolactina
RIA	radioinmunoensayo
sc	subcutánea
SEM	error estándar de la media
T	temperatura
TGF-β	factor de crecimiento transformante beta
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UI	unidades internacionales
V	voltios
V <sub>max</sub>	velocidad máxima
v/v	volumen en volumen
vs	versus

# INDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>1. EL OVARIO</b> .....	2
1.1. Estructura del ovario.....	2
1.2. El folículo ovárico.....	3
1.3. Desarrollo folicular.....	4
1.3.1. El folículo primordial.....	4
1.3.2. El folículo preantral.....	6
1.3.3. El folículo antral o terciario.....	8
1.3.3.1. La teoría de dos células, dos gonadotrofinas.....	10
1.3.3.2. Selección del folículo dominante.....	12
1.3.3.3. Mecanismos de retroalimentación.....	14
1.3.4. El folículo preovulatorio o folículo de <i>de Graaf</i> .....	16
1.4. Ovulación.....	18
1.5. El cuerpo lúteo.....	20
1.6. El ciclo ovárico en la rata.....	25
1.7. Esteroidogénesis en células luteales.....	27
1.7.1. Origen del colesterol.....	27
1.7.2. Ruptura de la cadena lateral del colesterol.....	30
1.7.3. Síntesis de progesterona.....	30
1.7.4. Síntesis de andrógenos.....	32
1.7.5. Aromatización de andrógenos.....	32
1.7.6. Metabolismo de la progesterona.....	33
1.7.7. Regulación de la síntesis y secreción de progesterona.....	33
1.7.7.1. Receptores de LH.....	33
1.7.7.2. Efecto de la LH sobre la esteroidogénesis.....	35
<b>2. LA INSULINA</b> .....	39
2.1. Estructura, síntesis y secreción de insulina.....	39
2.2. Efectos metabólicos de la insulina.....	41
2.3. Características del receptor de insulina.....	42
2.4. Internalización del complejo hormona-receptor.....	44
2.5. Mecanismo de acción de la insulina.....	46
2.5.1. El principal sustrato del receptor de insulina: IRS-1.....	49
2.6. Factores de crecimiento semejantes a la insulina.....	53
2.7. Diabetes.....	55
2.8. Insulina y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos.....	57
<b>3. INSULINA Y OVARIO</b> .....	59

3.1. Diabetes y función reproductiva.....	59
3.1.1. La diabetes por estreptozotocina como modelo experimental.....	60
3.2. Efecto de la insulina sobre el ovario.....	61
3.3. Producción y acción de los factores de crecimiento semejantes a la insulina en el ovario.....	63
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>67</b>
<b>1. MATERIALES.....</b>	<b>68</b>
<b>2. ANIMALES.....</b>	<b>69</b>
2.1. Condiciones generales.....	69
2.2. Tratamientos.....	70
2.2.1. Obtención de ratas superovuladas.....	70
2.2.2. Inducción de la diabetes por estreptozotocina (STR).....	70
2.2.3. Evaluación del estado diabético.....	71
2.2.4. Tratamiento <i>in vivo</i> con insulina.....	72
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>72</b>
3.1. Aislamiento de células luteales de ovarios altamente luteinizados.....	72
3.2. Medición de la actividad de fosfodiesterasa (PDE).....	73
3.2.1. Incubación de células luteales con insulina y preparación de las fracciones celulares para la medición de PDE.....	73
3.2.2. Purificación de la PDE.....	74
3.2.3. Determinación de la actividad de PDE.....	74
3.3. Determinación de AMPc intracelular.....	75
3.3.1. Marcación de AMPc.....	75
3.3.2. Medición de los niveles de AMPc.....	76
3.4. Determinación de receptores de LH/hCG.....	77
3.4.1. Preparación de hCG iodada.....	77
3.4.2. Determinación de la máxima capacidad de unión (MCU) de la <sup>125</sup> I-hCG.....	77
3.4.3. Ensayos de unión de hCG al receptor luteal.....	78
3.5. Incubación de células luteales con hLH.....	80
3.6. Medición de esteroides.....	80
3.6.1. Determinación de progesterona.....	81
3.6.2. Determinación de 20 $\alpha$ -hidroxi-progesterona.....	82
3.6.3. Determinación de pregnenolona.....	82
3.6.4. Determinación de estradiol.....	82
3.7. Estudio del metabolismo de la progesterona.....	82

3.7.1. Incubación de células luteales con progesterona radiactiva.....	82
3.7.2. Cromatografía en capa delgada.....	83
3.8. Determinación del contenido de citocromo P450 <sub>SCC</sub> en células luteales.....	83
3.8.1. Obtención de fracciones mitocondriales de células luteales.....	83
3.8.2. Inmunolocalización del citocromo P450 <sub>SCC</sub> .....	84
3.9. Incubaciones de células luteales con un sistema generador de NADPH.....	85
3.10. Purificación y cultivo de células luteales.....	85
3.11. Regulación de la síntesis <i>de novo</i> del citocromo P450 <sub>SCC</sub> .....	87
3.11.1. Incorporación de <sup>35</sup> S-metionina en células luteales en cultivo.....	87
3.11.2. Inmunoprecipitación del citocromo P450 <sub>SCC</sub> .....	87
3.12. Determinación de proteínas.....	88
3.13. Medición del contenido de ADN celular.....	88
3.14. Estadística.....	89
<b>RESULTADOS</b> .....	90
<b>Capítulo 1:</b> Efecto de la diabetes por estreptozotocina sobre la actividad de fosfodiesterasa en células luteales.....	91
<b>Capítulo 2:</b> Acción de la insulina <i>in vitro</i> sobre células luteales.....	105
2.1. Efecto de un sistema generador de NADPH sobre células luteales. Modulación por LH e insulina.....	105
2.2. Comparación de los efectos de la insulina y el IGF-I sobre la esteroidogénesis en células luteales.....	117
2.3. Efecto de la insulina sobre el contenido de citocromo P450 <sub>SCC</sub> en células luteales en cultivo.....	127
<b>Capítulo 3:</b> Efecto <i>in vivo</i> de la insulina sobre células luteales.....	129
<b>DISCUSION</b> .....	146
<b>Capítulo 1:</b> Efecto de la diabetes por estreptozotocina sobre la actividad de fosfodiesterasa en células luteales.....	147
<b>Capítulo 2:</b> Acción de la insulina <i>in vitro</i> sobre células luteales.....	151
2.1. Efecto de un sistema generador de NADPH sobre células luteales. Modulación por LH e insulina.....	151
2.2. Comparación de los efectos de la insulina y el IGF-I sobre la esteroidogénesis en células luteales.....	156
2.3. Efecto de la insulina sobre el contenido de citocromo P450 <sub>SCC</sub> en células luteales en cultivo.....	159
<b>Capítulo 3:</b> Efecto <i>in vivo</i> de la insulina sobre células luteales.....	160
<b>CONCLUSIONES</b> .....	168
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	172

# ***INTRODUCCION***

## 1. EL OVARIO

### 1.1. Estructura del ovario

En los mamíferos, los ovarios son órganos pares, aproximadamente iguales en tamaño, que se localizan en la cavidad abdominal. Están conectados por un mesenterio (*mesovarium*) a la parte dorsal del ligamento ancho, cuyos bordes medios y laterales pueden condensarse como ligamentos suspensorios o infundíbulo-pélvicos. Los vasos sanguíneos llegan al ovario a través del mesenterio. En algunas especies, los ovarios están encerrados en una cápsula peritoneal o bursa ovárica, que varía considerablemente en desarrollo y en el grado de comunicación con la cavidad celómica. En la rata, el ratón, perro, oso y muchos otros carnívoros, el espacio periovárico se comunica con la cavidad peritoneal por un estrecho pasaje, que permite el intercambio de fluidos [12,200,424].

En muchos mamíferos, el ovario quiescente es un ovoide pequeño y aplanado, de estructura compacta y con una superficie relativamente lisa. Al alcanzarse la edad reproductiva, el órgano comienza a engrosarse, debido al crecimiento de los folículos, y aparecen protrusiones sobre su superficie a medida que los folículos maduran. En animales de ovulación múltiple, la apariencia del ovario es la de un racimo de uvas. En cambio, en otros animales, como el caballo, la oveja y los primates, el contorno normal del ovario se halla sólo localmente alterado (por ejemplo, por un gran cuerpo lúteo o folículo de *de Graaf*).

El ovario adulto está cubierto por un epitelio, usualmente monoestratificado, de células cúbicas o poliédricas, llamado epitelio germinal. Esta

cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente (la túnica albugínea), formando pequeños pliegues, hoyos o criptas [149]. El epitelio germinal está separado de la túnica albugínea por una fina membrana basal.

## 1.2. El folículo ovárico

En 1672, Regnier de Graaf describió por primera vez la diferenciación de los folículos ováricos a cuerpos lúteos. Expresó que "la edad y el coito causan grandes cambios en los huevos (*folículos*). Son muy pequeños en animales jóvenes y más grandes en los más desarrollados. Luego del coito, se modifican (*los folículos*), para asemejarse a los glóbulos (*cuerpos lúteos*)..., siendo uno o más de acuerdo a que el animal vaya a producir uno o más fetos." [82]

Desde entonces, el folículo ovárico ha sido considerado como la unidad funcional del ovario. Su función es la de proveer el sistema de soporte necesario para que la célula germinal femenina, el ovocito, alcance su máximo potencial, es decir que adquiera la capacidad para unirse a una célula germinal masculina, el espermatozoide, para producir un embrión capaz de desarrollarse hasta llegar al nacimiento.

Las células somáticas del folículo participan de varias maneras para cumplir esta función esencial para la reproducción y la supervivencia de las especies. Inicialmente, proveen los requerimientos nutritivos del ovocito que crece y, posiblemente, el estímulo que inicia su crecimiento. Luego, controlan la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos contenidos en aquellos folículos seleccionados para la ovulación y contribuyen a la atresia y destrucción de los ovocitos en los folículos no seleccionados. Estos efectos directos de las células

foliculares sobre el desarrollo y destino de los ovocitos que circundan son mediados por cambios que producen en el microambiente del folículo, principalmente a través de productos que secretan al fluido folicular que baña al ovocito. Además, células foliculares especializadas (células del cúmulus) que forman la capa más interna que rodea al ovocito, están metabólicamente acopladas a él, a través de uniones estrechas ("gap junctions"), que permiten la entrada de nutrientes y moléculas regulatorias al ooplasma.

### **1.3. Desarrollo folicular**

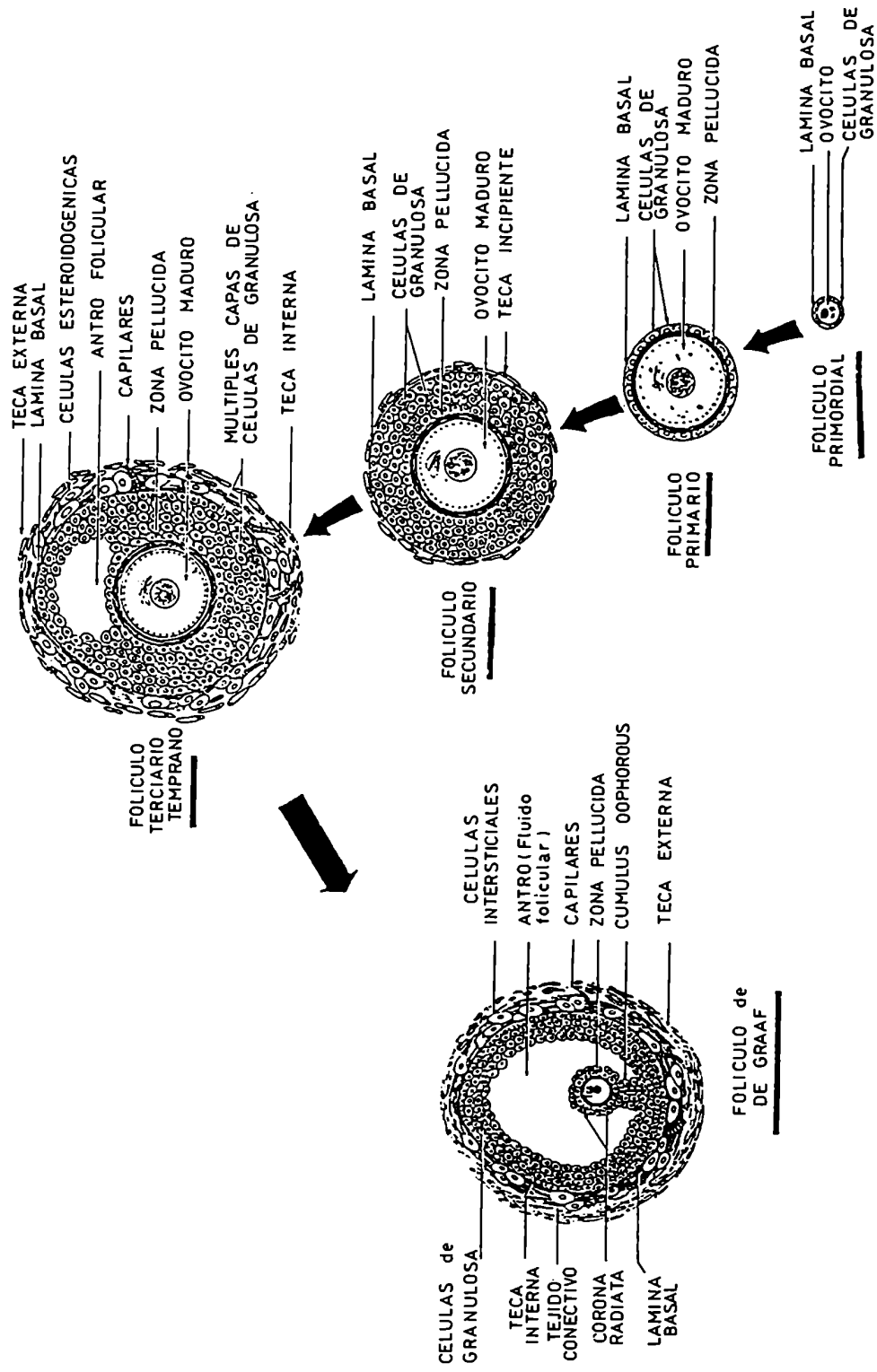
Si bien el desarrollo folicular está regulado principalmente por las gonadotrofinas hipofisarias (FSH y LH), no todos los folículos de un ovario responden a las gonadotrofinas en un ciclo determinado. En realidad, solamente un número limitado de folículos llegará a la ovulación durante la vida de la hembra, mientras que la mayoría de ellos se volverán atrésicos. Luego de la ovulación, las células foliculares sufrirán profundos cambios en su sensibilidad hormonal y en su capacidad de producir esteroides, diferenciándose para formar el cuerpo lúteo.

Las distintas etapas del desarrollo de un folículo ovárico son las siguientes: folículo primordial, folículo preantral (que abarca los estadios de folículo primario y secundario según otras clasificaciones), folículo antral o terciario y folículo preovulatorio o de *de Graaf* (Fig. 1).

#### ***1.3.1. El folículo primordial***

El folículo primordial está compuesto por un ovocito, arrestado en el estadio de diplotene de la profase meiótica, rodeado por una única capa de células





**Figura 1.** Esquema que muestra la arquitectura y la clasificación de los diferentes estadios del desarrollo folicular. De: Erickson et al. (1985). The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. Endocr.Rev. 6:371-399.

planas epiteliales, las células de la granulosa. No contiene tejido conectivo ni células de la teca. Los folículos primordiales constituyen un reservorio de folículos en estado de reposo, cuyo número disminuye a lo largo de la vida reproductiva de la especie. La iniciación del crecimiento folicular es un proceso continuo, independiente de la acción de las gonadotrofinas [310]. Aun en ausencia de influencias hipofisarias, el folículo puede alcanzar el estadio preantral temprano. Este crecimiento folicular limitado ocurre ininterrumpidamente, inclusive en la hembra prepúber y durante la preñez [311]. La velocidad a la cual los folículos inactivos comienzan a crecer parece ser directamente proporcional al número de folículos remanentes y decrece con la edad. Si bien no se conoce cuál es el estímulo que inicia el crecimiento folicular, la diferenciación celular normal y el desarrollo progresivo dependen de las gonadotrofinas y de la esteroidogénesis ovárica.

### *1.3.2. El folículo preantral*

Una vez iniciado el crecimiento, el folículo progresa hasta el estadio preantral, a medida que se agranda el ovocito, que ahora está rodeado por una cubierta glicoproteica, la zona pellucida. La capa de células planas que rodea al ovocito aumenta su espesor y sus células devienen cúbicas. Esta capa se vuelve rápidamente multilaminar, debido a la proliferación de las células de granulosa, y comienza a organizarse una envoltura externa, derivada del estroma ovárico: las células de la teca.

Las células de la granulosa del folículo preantral tienen la capacidad de sintetizar los tres tipos de esteroides ováricos (progestágenos, andrógenos y estrógenos) en cantidades limitadas. Sin embargo, se producen significativamente más estrógenos que andrógenos o progestágenos [163,254]. La enzima aromatasa cataliza

la conversión de andrógenos a estrógenos (aromatización) y parece ser el factor limitante de la producción ovárica de estrógenos. La enzima es inducida o activada por la FSH [268], de modo que la producción de estrógenos está limitada por el número de receptores para la hormona. Las células de granulosa preantrales presentan receptores específicos de FSH y, en presencia de la hormona, el folículo preantral puede aromatizar pequeñas cantidades de andrógenos y generar su propio microambiente estrogénico [254,288]. Además, la FSH se combina con los estrógenos para ejercer un efecto mitogénico sobre las células de granulosa y estimular su proliferación [134,324]. Los estrógenos junto con la FSH promueven una rápida acumulación de receptores de FSH, como consecuencia de un aumento en el número de células de granulosa y de un cambio en la densidad de receptores de cada célula [324].

El papel de los andrógenos en el desarrollo folicular temprano es complejo. En el citoplasma de las células de granulosa se han identificado receptores específicos de andrógenos [353]. Además de servir como sustrato de la aromatización, los andrógenos activarían a la aromatasa, ya que inhibiendo la translocación nuclear del complejo andrógeno-receptor se bloquea esta actividad [77,162]. Resulta interesante, sin embargo, que en células de granulosa preantrales sometidas *in vitro* a un ambiente rico en andrógenos, se ve favorecida la conversión de androstenodiona a andrógenos más potentes y no a estrógenos [257]. Estos productos, como dihidrotestosterona y androstanodiona, no son aromatizables y, de hecho, pueden inhibir la actividad de aromatasa [165].

Por lo tanto, el destino del folículo preantral depende de un delicado balance. En bajas concentraciones, los andrógenos aumentan su propia aromatización y contribuyen a la producción de estrógenos. En concentraciones más altas, la

capacidad limitada de aromatización es sobrepasada y el folículo deviene androgénico y, finalmente, atrésico. Un desarrollo limitado de las células de la teca, la principal fuente de andrógenos foliculares, puede minimizar los andrógenos disponibles. Sin embargo, la atresia, al igual que el comienzo del crecimiento folicular, es un proceso continuo. Es posible que los folículos progresen en su desarrollo sólo si emergen cuando la FSH está elevada y la LH baja. Aquellos folículos que comiencen su desarrollo en la fase lútea tardía o al comienzo de un nuevo ciclo serían favorecidos por un ambiente en el que prevalece la aromatización en las células de granulosa.

### *1.3.3. El folículo antral o terciario*

En el estadio antral, las células de la teca se dividen en dos capas: una capa interior, glandular y muy vascularizada, denominada teca interna, y otra exterior, compuesta de tejido conectivo y que puede contener fibras de músculo liso, llamada teca externa. Numerosos vasos sanguíneos y linfáticos penetran la teca externa y se comunican con un fino plexo de vasos en la teca interna; la capa de células de granulosa es avascular hasta después de la ovulación. Una fina membrana propia, compuesta por colágeno tipo IV, laminina y fibronectina, separa a esta capa de la teca interna [25]. De acuerdo a Solomons y Gatenby [372], esta membrana se forma a partir de la teca interna, pero otros consideran que está compuesta por dos estratos, cada uno de ellos conectado a la capa celular adyacente y, quizás, formado por ella [331].

Bajo la influencia sinérgica de los estrógenos y la FSH, se produce un aumento concomitante de la producción de fluido folicular, que comienza a acumularse en los espacios intercelulares de las células de granulosa hasta que se forma una cavidad (el antro), a medida que el folículo transita hacia el estadio antral.

Con la formación del antro, el fluido folicular provee el medio en el cual el ovocito y las células de granulosa que lo rodean pueden nutrirse en un ambiente endócrino único para cada folículo. El contenido del fluido folicular sugiere que deriva en parte del plasma y en parte de productos secretorios de las células de granulosa [98]. Su concentración proteica es levemente menor que la de la sangre. Entre las sustancias que se encuentran en el fluido folicular, se pueden mencionar proteínas plasmáticas, enzimas intra y extracelulares, mucopolisacáridos, esteroides, hormonas proteicas hipofisarias y distintos factores ováricos no esteroideos [58,98,252].

Morfológicamente, las células de granulosa están laxamente empaquetadas y presentan "gap junctions", permitiendo el libre pasaje de sustancias hacia el interior del folículo. También es fácil el acceso al interior del mismo ovocito, a través de las células del cúmulus, que están conectadas con él [130]. El significado adaptativo del microambiente que proporciona el fluido folicular es claro: el compartimiento de fluido permite el acceso de las moléculas de FSH y LH hasta sus receptores celulares, proveyendo un área local para la amplificación de señales. Por lo tanto, en el ovario, folículos contiguos pueden estar en diferentes estadios de crecimiento, pero todas las células de un folículo determinado están inmersas en el mismo ambiente.

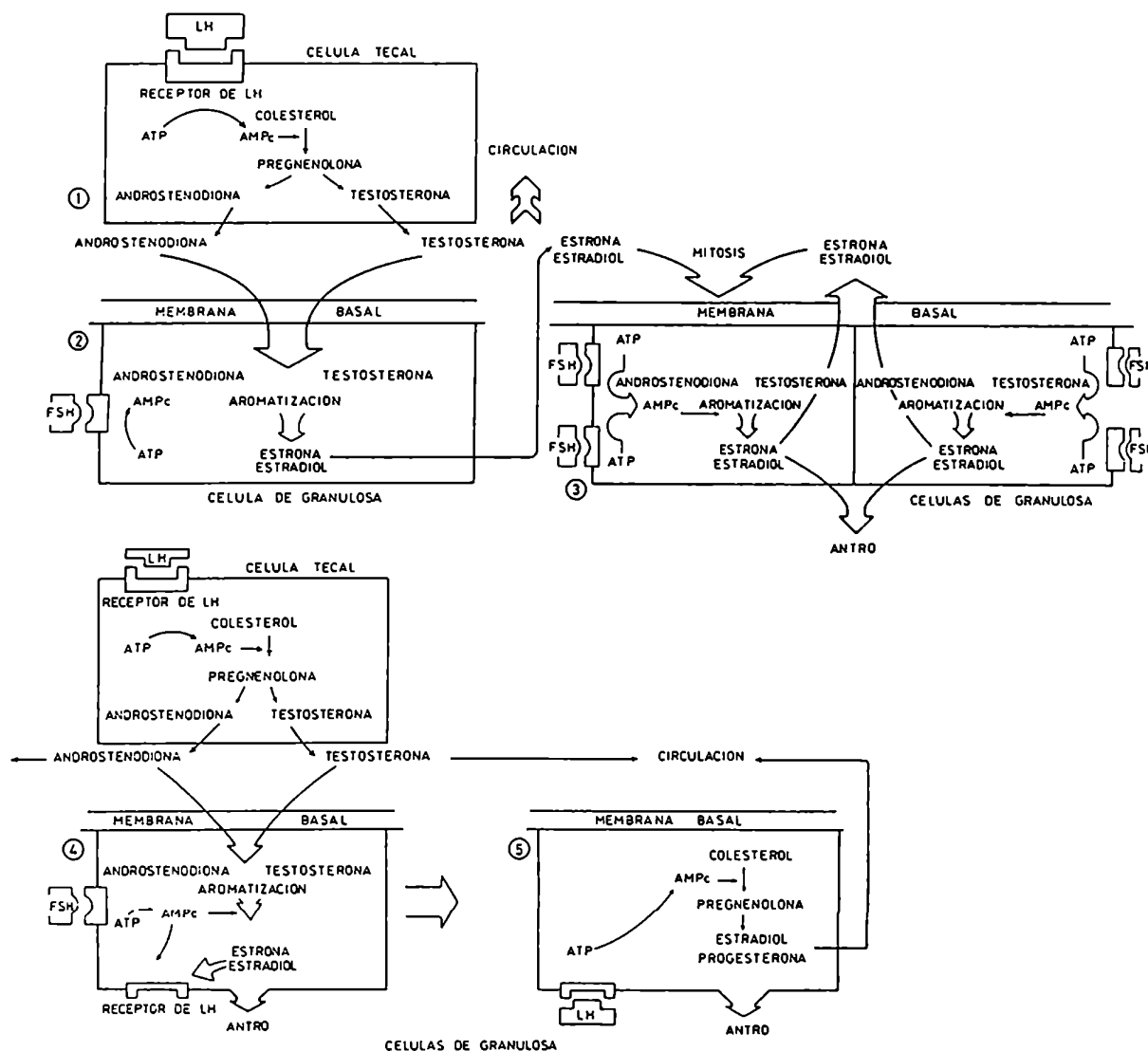
La presencia de estrógenos y FSH en el fluido antral es esencial para la acumulación sostenida de células de granulosa y para el crecimiento folicular continuo [258]. Los folículos antrales con mayores tasas de proliferación de sus células de granulosa contienen las mayores concentraciones de estrógenos, las menores relaciones andrógenos/estrógenos y tendrán una mayor probabilidad de mantener un ovocito viable. Mientras que un ambiente estrogénico estimula la proliferación de las células de granulosa, la sensibilidad a la FSH y la aromatización,

un entorno androgénico, por el contrario, antagoniza la proliferación inducida por los estrógenos y, si es sostenido, promueve cambios degenerativos en el ovocito.

### ***1.3.3.1. La teoría de dos células, dos gonadotrofinas***

Los esteroides presentes en el fluido folicular suelen encontrarse frecuentemente en concentraciones varios órdenes de magnitud mayores que las detectadas en plasma y reflejan la capacidad funcional de las células de granulosa y teca circundantes [26]. La síntesis de hormonas esteroideas parece estar compartimentalizada dentro del folículo. Si bien cada compartimiento retiene la capacidad de producir progestágenos, andrógenos y estrógenos, la actividad de aromatasa de las células de granulosa excede largamente la observada en las células teca [164,254]. En estas últimas no se han detectado receptores de FSH. Por lo tanto, las células de granulosa muestran una producción preferencial de estrógenos, mientras que la síntesis de andrógenos predomina en las células de la teca [165,256,398]. Estudios *in vitro* con células de granulosa y de la teca han servido para demostrar un efecto cooperativo de ambos tipos celulares para la producción de hormonas esteroideas [36,93,254,255,269,398]. Así surgió el concepto de "dos células, dos gonadotrofinas" en la esteroidogénesis ovárica (Fig. 2). En respuesta a la LH, las células teca son estimuladas para producir andrógenos, que pueden ser luego convertidos en estrógenos, a través de la aromatización inducida por FSH en las células de granulosa [269].

La interacción local entre los compartimientos tecal y de granulosa, que da como resultado una producción acelerada de estrógenos, no parece ser completamente funcional hasta un estadio antral tardío. Las células de granulosa de folículos antrales pequeños, al igual que las granulosas preantrales, muestran *in vitro* una tendencia a



**Figura 2.** La teoría de "dos células, dos gonadotrofinas" para la esteroidogénesis folicular. (1) La LH estimula la producción tecal de andrógenos. (2) Androstenodiona y testosterona son convertidos a estrona y estradiol por aromatización inducida por FSH en las células de granulosa. (3) La FSH induce un aumento en el desarrollo de sus propios receptores. Juntos, FSH y estradiol estimulan la proliferación de la granulosa, lo que resulta en un incremento de los receptores de FSH y de la producción de estrógenos. (4) Potenciada por el estradiol, la FSH induce receptores de LH en las células de granulosa. (5) Actuando por su propio receptor, la LH inicia la luteinización, resultando en la producción de progesterona. De: **Fritz y Speroff. (1982).** The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fertil.Steril.* 38:509-528.

convertir cantidades significativas de andrógenos a las formas más potentes  $5\alpha$ -reducidas. En contraste, células de granulosa aisladas de folículos antrales grandes metabolizan preferencialmente los andrógenos a estrógenos [257].

En un estadio temprano del desarrollo, el balance relativo entre las actividades de aromatasa y reductasa puede afectar la capacidad del folículo para generar un entorno estrogénico que sostenga un crecimiento continuado. Más adelante, la acumulación rápida de receptores de FSH por medio de la proliferación de las células de granulosa estimula la aromatización de andrógenos derivados de un compartimiento tecal en desarrollo. Luego, el esfuerzo combinado de ambos compartimientos resulta en una producción más eficiente de estradiol, necesaria para generar el pico preovulatorio de estrógenos.

#### *1.3.3.2. Selección del folículo dominante*

La interacción entre los estrógenos y la FSH, crucial para promover y mantener el crecimiento y maduración folicular, puede jugar también un papel central en la selección de los folículos destinados a ovular. Si bien los estrógenos ejercen una influencia positiva sobre la acción de la FSH dentro de los folículos que están madurando, la retroalimentación negativa que producen sobre la liberación de FSH a nivel hipotálamo-hipofisario puede servir para privar a otros folículos menos desarrollados de un sustento gonadotrófico adecuado [431]. Este descenso en la FSH podría conducir a una disminución de la actividad de aromatasa dependiente de FSH, limitando por lo tanto la producción de estrógenos en los folículos menos maduros. Esto interrumpiría la proliferación de las células de granulosa e iniciaría una secuencia de eventos promoviendo la conversión hacia un microambiente androgénico, que induciría la atresia irreversible. Este mecanismo sería el responsable



del proceso de selección de los folículos dominantes, por el cual sólo unos pocos folículos llegarán a la ovulación en cada ciclo.

Sin embargo, esta explicación trae consigo una aparente paradoja. La exquisita sensibilidad de la retroalimentación negativa de los estrógenos sobre la liberación de FSH puede servir para inhibir el desarrollo de todos los folículos, excepto los dominantes; pero los folículos dominantes también dependen de la FSH y deben completar su desarrollo preovulatorio haciendo frente a niveles plasmáticos descendentes de la hormona. Los folículos seleccionados deben retener, por lo tanto, una sensibilidad única a la FSH para poder escapar a las consecuencias de la disminución de la gonadotropina inducida por su propia producción acelerada de estrógenos. Una tasa de proliferación de las células de granulosa que sobrepasa a la de sus congéneres les confiere a los folículos dominantes la ventaja de un mayor contenido de receptores de FSH. Como resultado, el estímulo para la aromatización es mantenido en estos folículos, pero no en los menos desarrollados. Rápidamente, los folículos seleccionados desarrollan una capacidad para la producción de estrógenos que excede la contribución de todos los demás folículos en conjunto. Además, la acumulación de una masa más importante de células de granulosa es acompañada por un aumento del desarrollo de la vasculatura de la teca, ofreciendo un acceso preferencial de la FSH a estos folículos que también poseen el mayor número de receptores de la hormona. Estos eventos hacen posible que los folículos dominantes retengan una sensibilidad única a la FSH y permiten un desarrollo preovulatorio continuado a pesar de los niveles menguantes de la gonadotropina.

Los folículos seleccionados sacan una ventaja adicional de su mayor contenido de receptores y del acceso fácil de la gonadotropina. La FSH induce el desarrollo de receptores de LH en las células de granulosa de los folículos antrales

grandes [432]. La velocidad de aparición de receptores de LH aumenta marcadamente con una exposición creciente a los estrógenos [326]. La capacidad para una respuesta continuada a niveles decrecientes de FSH y la alta concentración local de estrógenos resultante en los folículos dominantes proveen condiciones óptimas para el desarrollo de receptores de LH. La producción aumentada de estrógenos, expresión de la dominancia, actúa centralmente para estimular el pico de LH y localmente para promover la inducción de los receptores requeridos para la respuesta.

Además de inducir receptores de LH, se ha demostrado que la FSH induce receptores específicos de PRL en células de granulosa de rata [415]. Es más, la PRL parece interferir con la aromatización inducida por FSH en esta especie [415]. La PRL está siempre presente en el fluido folicular, aunque su concentración va descendiendo progresivamente durante la foliculogénesis y es mínima en la fase preovulatoria [253].

#### ***1.3.3.3. Mecanismos de retroalimentación***

Los mecanismos involucrados en la producción de estrógenos durante el desarrollo folicular incluyen complejas relaciones de retroalimentación con las gonadotrofinas hipofisarias. De esta manera, la sucesión de eventos en el ovario puede estar coordinada con centros en el hipotálamo y en la hipófisis. Principalmente a través de su producción de estrógenos, los folículos seleccionados pueden asumir el control de su propio destino. Alterando la secreción de gonadotrofinas a través de mecanismos de retroalimentación, estos folículos pueden optimizar su microambiente, en detrimento de los demás folículos.

La liberación hipofisaria de FSH es exquisitamente sensible a la influencia negativa de los estrógenos, aun en bajas concentraciones, respondiendo en forma casi inmediata [207]; a niveles más elevados de estrógenos, la supresión de la FSH es profunda y sostenida. En contraste, el efecto de los estrógenos sobre la liberación de LH varía con la concentración y la duración de la exposición. A niveles bajos y moderados, los estrógenos ejercen una retroalimentación negativa sobre la LH, al igual que sobre la FSH. A niveles más altos, sin embargo, los estrógenos son capaces de ejercer un efecto de retroalimentación positiva sobre la liberación de LH, siendo esta respuesta dependiente tanto de la magnitud como de la duración del estímulo estrogénico [207].

La transición de supresión a estimulación de la liberación de LH parece ocurrir a medida que la concentración de estradiol se eleva hacia la mitad de la fase folicular. Sin embargo, para ejercer una retroalimentación positiva suficiente como para inducir el pico preovulatorio de LH, los niveles de estrógenos deben alcanzar un valor umbral, que en el humano y en los roedores se aproxima a los 200 pg/ml [429].

Además de los mecanismos de retroalimentación que involucran a los esteroides gonadales, se debe mencionar la acción similar que ejercen compuestos no esteroideos, presentes en el fluido folicular. Estos son la inhibina y la activina (pertenecientes a una familia de péptidos relacionados estructuralmente con el TGF- $\beta$  [426]) y la folistatina. La inhibina es una glicoproteína producida por las células de granulosa y luteales de rata y humanas, en un proceso regulado por factores locales y endócrinos [48], que inhibe selectivamente la liberación hipofisaria de FSH [330]. La elucidación de su estructura mostró que está constituida por dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\beta A$  y  $\beta B$ ). Estas dos subunidades están unidas por puentes disulfuro y dan lugar a los dímeros biológicamente activos  $\alpha$ - $\beta A$  y  $\alpha$ - $\beta B$  [83]. Poco después de la purificación

de esta glicoproteína, se describió que homo- y heterodímeros de las subunidades  $\beta$  de la inhibina forman moléculas biológicamente activas que estimulan selectivamente la liberación de FSH de cultivos de células hipofisarias [231,405]. Estos dímeros ( $\beta$ A- $\beta$ A y  $\beta$ A- $\beta$ B) recibieron el nombre de activinas. También se aisló a partir de fluido folicular porcino una tercera actividad regulatoria de la FSH, estructuralmente distinta de las inhibinas. Se trata de una glicoproteína de cadena única, denominada folistatina [400], que inhibe selectivamente la liberación de FSH en células hipofisarias de rata *in vitro* [427].

#### ***1.3.4. El folículo preovulatorio o folículo de de Graaf***

En este estadio del desarrollo folicular, las células de granulosa se agrandan y adquieren inclusiones lipídicas, mientras que en las células de la teca aparecen vacuolas y aumenta la vascularización. El ovocito resume la meiosis, acercándose a completar la división reduccional.

El folículo preovulatorio produce cantidades crecientes de estrógenos, a medida que va madurando. Los niveles de estradiol se elevan rápidamente, alcanzándose un pico antes o inmediatamente después del pico de LH [119]. Por lo tanto, la FSH declina gradualmente hasta su nadir, justo antes del pico combinado de gonadotrofinas de la mitad del ciclo. Concentraciones sostenidas de estradiol por sobre el umbral estimulan el pico de LH. En ausencia de FSH o de estrógenos suficientes, la respuesta de los folículos a la LH se evidencia como atresia más que luteinización [326]; por lo tanto, además de proveer el estímulo ovulatorio para los folículos seleccionados, el pico de LH parece servir para sellar la suerte de los folículos remanentes. Actuando a través de sus receptores, la LH promueve la

luteinización de las células de granulosa y tecaes, lo que resulta en la producción de progesterona.

La producción de esteroides está substancialmente alterada entre el momento del pico de LH y la ovulación. Después de unos minutos, hay un aumento transiente de la secreción de estrógenos y progesterona en varias especies, incluyendo rata, mono y conejo, seguido por un marcado descenso a niveles basales luego de unas horas [19,160, 169,195,227,304,430]. Esta fase inhibitoria que sigue al pico de LH se caracteriza por bajas concentraciones de andrógenos aromatizables y estrógenos en el fluido folicular de los ovarios de todas las especies estudiadas [89,133,173,278,390].

Numerosas evidencias en células luteales [70,176,205] y de granulosa [184,185] indican que las altas concentraciones de LH que se alcanzan en el momento del pico preovulatorio de la gonadotropina causan una desensibilización transiente de sus receptores, por lo que las células efectoras se hacen refractarias a la estimulación por LH de la adenilato ciclase y de la consiguiente producción de esteroides. Sin embargo, luego de la ovulación, las células recuperan su capacidad de responder a la gonadotropina; en los roedores, esta recuperación de receptores es estimulada por la prolactina [327].

En la rata, se observa un gran pico preovulatorio de progesterona y  $20\alpha$ -hidroxi-progesterona cercano al momento del pico de LH. Estos altos niveles de progestágenos probablemente provengan de las células de granulosa que comienzan a luteinizarse, aunque se desconoce la contribución de las células tecaes. Este aumento en los niveles de progesterona tiene una inmensa importancia fisiológica. Tanto en humanos como en rata, hay fuertes evidencias que sugieren que sin el incremento

preovulatorio de progesterona el pico de FSH que acompaña al de LH no ocurre [245]. La progesterona afecta la respuesta a la retroalimentación positiva de los estrógenos de manera dosis- y tiempo-dependiente. La hormona facilita la respuesta a la retroalimentación positiva de los estrógenos, induciendo un pico combinado de FSH y LH, sólo cuando el aumento en sus niveles tenga lugar luego de una adecuada exposición a los estrógenos. Esta acción podría ayudar a coordinar el estímulo ovulatorio con la maduración del folículo preovulatorio [387].

#### **1.4. Ovulación**

El pico de LH parece ser el estímulo para la reanudación de la meiosis en el ovocito, la luteinización de las células de granulosa y de la teca y la síntesis de prostaglandinas, que serán esenciales para la ruptura del folículo [226,397,419]. A medida que se incrementan los niveles de LH, la concentración intracelular de AMPc aumenta en el folículo preovulatorio [286]. Esta acumulación del nucleótido cíclico inducida por LH mediaría tanto la maduración del ovocito como la luteinización de las células foliculares [397,419]. Se presume que el AMPc no actuaría en forma directa, sino que superaría la inhibición local de estos procesos producida por dos inhibidores presentes en el fluido folicular: el inhibidor de la maduración del ovocito (OMI) y el inhibidor de la luteinización (LI). La función de estos dos reguladores sería la de prevenir la maduración ovocitaria y la luteinización prematuras, respectivamente [60]. Difieren de la inhibina en que actúan localmente y no a través de un mecanismo inhibitorio central.

Luego del pico de LH, la concentración de progesterona en el folículo preovulatorio continúa aumentando, hasta la ovulación [312]. Este esteroide, a través de una retroalimentación negativa, sería el responsable de la finalización del pico de

LH [155]. Otra importante función de la progesterona es la de aumentar la dilatabilidad de la pared del folículo [312]. Un cambio en las propiedades elásticas de la pared folicular parece ser necesario para explicar el rápido aumento del volumen del fluido folicular que ocurre justo antes de la ovulación, sin ninguna variación en la presión intrafolicular [232]. Se ha sugerido que la LH, a través de la elevación del AMPc y/o de la producción de progesterona, puede aumentar la actividad de enzimas proteolíticas, como colagenasa y plasmina, causando la digestión del colágeno en la pared del folículo y aumentando su dilatabilidad [37,104].

Las prostaglandinas de las series E y F también están involucradas. Su concentración aumenta marcadamente en el folículo preovulatorio y es máxima en el momento de la ovulación [226]. El mecanismo por el cual las prostaglandinas inducen la ruptura del folículo es desconocido. Pueden actuar liberando enzimas lisosomales que digieran la pared folicular. Sin embargo, se ha descrito que la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  estimula las "contracciones" ováricas, producidas por fibras musculares lisas [298,412], las que podrían estar involucradas en la expulsión del complejo ovocito-cúmulus [14].

El pico de FSH que acompaña al de LH depende del incremento preovulatorio de la progesterona y tendría una función importante en el proceso ovulatorio. El activador de plasminógeno es necesario para la conversión del plasminógeno a la enzima proteolítica activa, la plasmina, que está involucrada en la ruptura de la pared del folículo. Su producción es más sensible a la estimulación por FSH que por LH [378]. En el ratón, la FSH, pero no la LH, estimula la mucificación de las células del cúmulus, sosteniendo al ovocito dentro del folículo [100]. La expansión del cúmulus permite que el complejo ovocito-cúmulus quede flotando libremente en el fluido antral justo antes de la ruptura del folículo [312]. Este proceso

involucra la deposición de una matriz de ácido hialurónico, cuya síntesis es inducida por FSH *in vitro* [101]. Por otra parte, y quizás como hecho más importante, la inducción de receptores de LH en las células de granulosa es una acción mediada específicamente por la FSH y un prerrequisito necesario para el proceso de luteinización y síntesis subsecuente de progesterona. Se ha descrito una alta incidencia de fases lúteas cortas o inadecuadas en ciclos en los cuales los niveles de FSH son bajos o han sido selectivamente suprimidos [90].

### **1.5. El cuerpo lúteo**

El cuerpo lúteo es una pequeña glándula que se desarrolla rápidamente a partir del folículo ovulado y que cumple una función vital en el proceso reproductivo: la secreción de progesterona, necesaria para la implantación del blastocisto. Luego de la implantación, la secreción continua de progesterona es esencial para el mantenimiento de un útero quiescente y de un ambiente intrauterino que conduzcan al desarrollo ininterrumpido del embrión [110]. Así, el trofoblasto fetal secreta hCG, que actuando a través de los receptores de LH, mantiene la capacidad del cuerpo lúteo de producir progesterona hasta que comience a hacerlo la placenta [428]. Si la fertilización o la implantación no ocurren, se produce la regresión del cuerpo lúteo y la consecuente disminución de la progesterona lleva a un aumento de la frecuencia de liberación de LH, a un aumento de la síntesis de estrógenos foliculares y al comienzo de una nueva fase folicular [192].

De este modo, el cuerpo lúteo puede ser visto como la última etapa del folículo ovárico, que luego de expulsar al ovocito, continúa nutriendo al huevo (fertilizado) indirectamente a través de la producción de progesterona. Los cambios progesteracionales en el útero deben preceder la llegada del embrión y requieren la



conversión rápida de un folículo mayoritariamente productor de estrógenos a un cuerpo lúteo mayoritariamente productor de progesterona. Este cambio es inducido por el pico preovulatorio de LH, que cumple el doble rol de estimular la ovulación y la luteinización [201].

La luteinización involucra cambios morfológicos y bioquímicos en las células de granulosa y de la teca interna del folículo preovulatorio, aunque las células de origen tecal son sólo una pequeña proporción del cuerpo lúteo [276]. Luego del estímulo ovulatorio, pero antes de la ovulación, se observa hipertrofia de las células de granulosa y aumento de la relación citoplasma/núcleo. Luego de la ovulación, se rompe la membrana basal y vasos sanguíneos de la teca interna invaden la cavidad del folículo roto [35]. Estos capilares se forman tanto por migración [35], como por mitosis de las células endoteliales [122], en un proceso que estaría regulado por un factor angiogénico secretado inmediatamente después de la ruptura del folículo [109,238]. Estos capilares forman una red vascular que representa un 20% del volumen del cuerpo lúteo, y aproximadamente un 60% de la superficie de cada célula luteal está en contacto directo con un capilar [87]. Además, se observan una marcada proliferación del retículo endoplasmático, su transformación de predominantemente rugoso a predominantemente liso y un incremento en la complejidad del aparato de Golgi. El contenido de mitocondrias también aumenta, y las mitocondrias pequeñas y redondas, con crestas laminares, que se observan en células de granulosa, se convierten en mitocondrias más grandes y de formas más variadas, con crestas tubulares [16].

El cuerpo lúteo está compuesto de por lo menos dos tipos de células esteroideogénicas, morfológicamente diferenciables: las células luteales grandes y pequeñas. Las células luteales grandes tienen un tamaño que oscila entre 20  $\mu\text{m}$  en

los roedores y 40  $\mu\text{m}$  o más en el humano [99], son de forma poliédrica, con un citoplasma claro y un gran núcleo en posición central. El retículo endoplasmático liso y el aparato de Golgi están muy desarrollados y las mitocondrias son abundantes. Presentan gránulos de secreción, cuyo contenido sería progesterona [348] o bien relaxina u oxitocina [2,418].

Las células luteales pequeñas son de forma ahusada, presentan un citoplasma oscuro, un núcleo irregular y poseen grandes gotas citoplasmáticas de contenido lipídico [292]. Su tamaño no supera los 20  $\mu\text{m}$ . El retículo endoplasmático liso está bien desarrollado, el aparato de Golgi tiene menor desarrollo y la cantidad de mitocondrias es menor que en las células luteales grandes. La diferencia fundamental con este tipo celular es la ausencia de gránulos de secreción.

Se ha propuesto que la cantidad de progesterona que secreta el cuerpo lúteo sería un balance entre el desarrollo de células con capacidad de secretar progesterona en forma basal y células con capacidad de responder al estímulo de LH. Se ha comprobado que las células luteales grandes son las que secretan mayor cantidad de progesterona en forma constitutiva y poseen pocos receptores de LH. En contrapartida, las células luteales pequeñas secretan proporcionalmente más progesterona en respuesta al estímulo de LH. Si bien se sabe que en algunas especies, como en bovinos, las células luteales grandes provienen de las células de granulosa y las pequeñas, de la teca [13,92], en el cuerpo lúteo humano y de rata se distinguen morfológica y funcionalmente células luteales grandes y pequeñas aunque no se ha podido determinar su origen [295,303]. De acuerdo a Parmer *et al.* [303], en la rata, la diferencia entre células luteales grandes y pequeñas podría residir, no en un origen celular diferente, sino en la capacidad de responder diferencialmente a determinados estímulos del ambiente folicular, como los factores de crecimiento.

La producción de progesterona en la fase lútea, y por lo tanto el ciclo de vida del cuerpo lúteo, se caracteriza por una primera etapa ascendente, un plateau y una etapa descendente. Esta síntesis de progesterona es una medida de la capacidad funcional del cuerpo lúteo y depende de varios factores. Numerosas evidencias indican que una función luteal normal requiere un desarrollo folicular preovulatorio óptimo [376]. En otras palabras, la acumulación de receptores de LH y la adecuada producción de esteroides y otros factores durante la fase folicular predetermina el grado de luteinización y la subsecuente capacidad funcional del cuerpo lúteo.

El cuerpo lúteo parece pertenecer a la misma clase de glándulas endócrinas a la que pertenecen la tiroides y la corteza adrenal; es decir, su producción de progesterona depende, en general, de hormonas tróficas hipofisarias. Sin embargo, se diferencia de estas glándulas por su naturaleza efímera y porque no existe una única hormona trófica para el cuerpo lúteo de todas las especies [338]. En algunas, esta luteotrofina puede ser la LH; en otras, la prolactina, y hasta en otras, combinaciones de prolactina y LH o FSH [147,161,337]. Además, aun en la misma especie, como sucede en la rata, el cuerpo lúteo puede secretar progesterona en respuesta a la prolactina durante la primera semana de vida, pero solamente en respuesta a prolactina y LH juntas durante la segunda semana [272,339]. Por otra parte, el estradiol también es una hormona luteotrófica en la rata [129] y algunos autores sugieren que la acción luteotrófica de la LH en rata y conejo es indirecta, a través de la estimulación de la síntesis de estrógenos requerida por el cuerpo lúteo [128,201].

Por ser una glándula efímera, el cuerpo lúteo tiene requerimientos inusuales: debe prepararse para su propia destrucción mientras cumple con su papel crucial de secretar progesterona [202]. Este complicado programa depende de la interrelación de la progesterona con las prostaglandinas (PG). En la década del '70 se

describió que la  $PGF_{2\alpha}$  (uterina en todas las especies, luteal en algunas) causa luteólisis en oveja, rata, ratón, conejo, cobayo, hamster, vaca, cerdo, caballo, gato y perro [338]. Sin embargo, como su efecto luteolítico no es tan fácil de ver en los primates, se ha dudado en considerar a las prostaglandinas como el agente final común de la luteólisis.

Durante la etapa ascendente del ciclo de vida del cuerpo lúteo, éste no responde a los efectos luteolíticos de las PG, mientras que en etapas más tardías sí lo hace [203,220]. En la rata y otros mamíferos, se ha descrito una relación inversa entre la secreción de progesterona y la producción intraluteal de prostaglandinas [141]. Sin embargo, se debe remarcar que en todas las especies en que las PG son luteolíticas, el cuerpo lúteo recibe una parte significativa de ellas del útero.

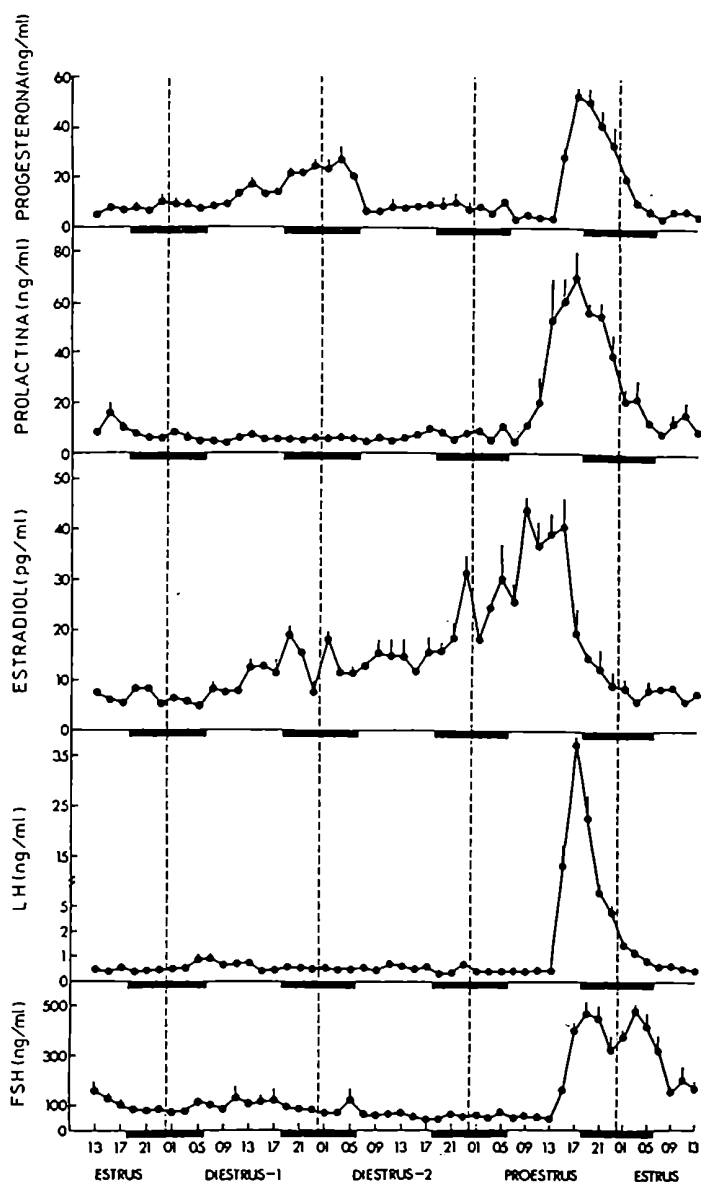
Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar los efectos luteolíticos de la  $PGF_{2\alpha}$ : un descenso rápido y dramático en el flujo sanguíneo luteal [283,293], una disminución en el número de receptores de LH [38], un desacoplamiento del receptor de LH y la adenilato ciclasa [111] y un efecto citotóxico [362]. Si bien existen evidencias que apoyan cada una de estas hipótesis, los efectos de la  $PGF_{2\alpha}$  parecen diferir entre distintas especies y las acciones demostrables *in vivo* frecuentemente difieren de las observadas *in vitro*.

Un gran número de cambios morfológicos se observan durante la regresión del cuerpo lúteo de rata [16]. El citoplasma de las células se llena de gotas lipídicas, en coincidencia con un incremento de 10 veces en la producción luteal de triglicéridos. Hay una disminución de la extensión del retículo endoplasmático liso y un aumento de la cantidad de vacuolas autofágicas y heterolisosomas. Las células en degeneración parecen ser removidas por macrófagos [301]. La vascularización del

cuerpo lúteo se empobrece, ya que el volumen porcentual ocupado por vasos sanguíneos decrece linealmente durante los últimos días del ciclo estral [293]. Al avanzar la regresión luteal, se produce una disminución del tamaño de las células esteroidogénicas, lo que resulta en un aglomeramiento de los componentes subcelulares. Esto hace que en la fase final de la regresión luteal se observen células en las cuales las organelas más prominentes son las gotas lipídicas y los lisosomas, mientras que las demás organelas se encuentran totalmente desorganizadas.

### **1.6. El ciclo ovárico en la rata**

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliéstrico. Esto es, el ciclo ovárico continúa durante todo el año y la ovulación no depende del estímulo de la cópula. La duración del ciclo es de 4 a 5 días, como consecuencia de una fase lútea breve, característica de los roedores. En la Figura 3 se pueden observar los cambios que ocurren en las concentraciones plasmáticas de gonadotrofinas y esteroides ováricos a lo largo del ciclo en la rata. El cuerpo lúteo del ciclo estral secreta progesterona solamente por 24 a 48 horas [49,369]. La gestación en la rata dura 22 días, requiriéndose el cuerpo lúteo hasta el día 17 para el mantenimiento de la preñez [75]. Por apareamiento con un macho estéril o por estimulación cervical se obtiene un estado de pseudopreñez, en el que el cuerpo lúteo continúa secretando progesterona hasta 12 días [308,359]. La superovulación por administración de gonadotrofinas induce también un estado de pseudopreñez, en el cual el ovario se compone de un altísimo porcentaje de células luteales, ya que se produce un gran número de cuerpos lúteos como resultado de la gran cantidad de folículos que se desarrollan por efecto del tratamiento. Estas células luteales poseen características morfológicas y capacidad de respuesta similar a las células luteales del ciclo o de la preñez temprana.



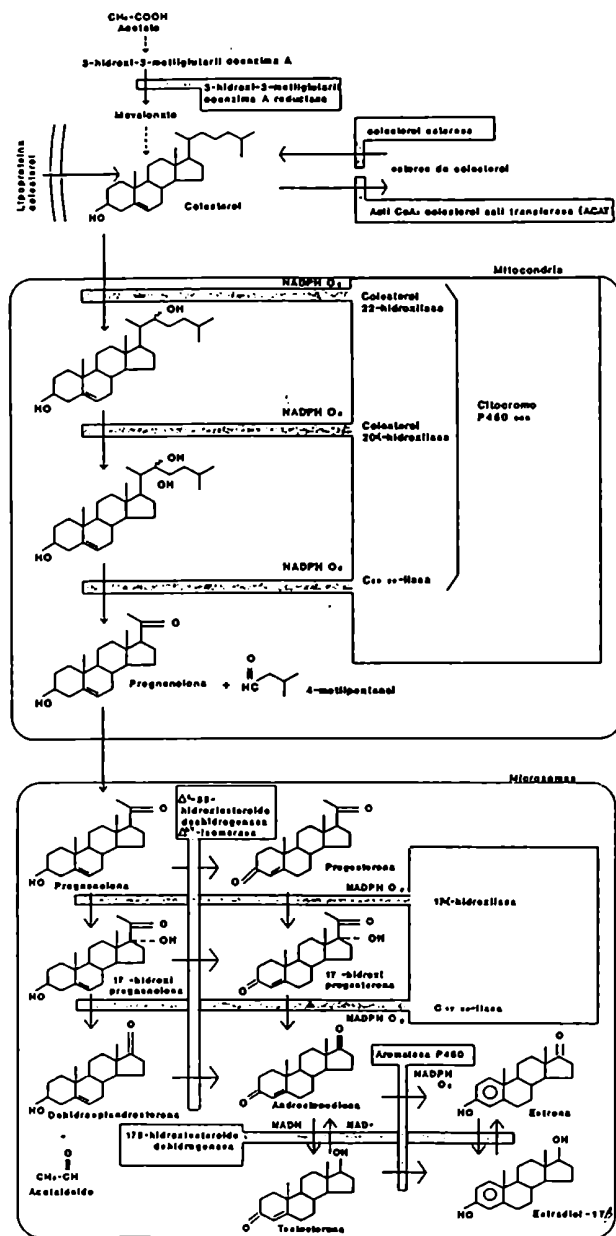
**Figura 3.** Niveles séricos de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH a lo largo de los cuatro días del ciclo en la rata. Los números en la abscisa indican la hora del día. La barra negra representa el período de oscuridad (de 18 a 6). De: **Smith et al. (1975)**. *Endocrinology* 96:219-226.

## **1.7. Esteroidogénesis en células luteales**

Los productos secretorios más conocidos y mejor caracterizados del ovario son las hormonas esteroideas. Los esteroides ováricos cumplen un gran número de funciones relacionadas con la reproducción. Tienen funciones endócrinas, actuando sobre tejidos y órganos del sistema reproductor, del sistema nervioso central, del músculo esquelético, sistemas cardiovascular e inmune, hígado y tejidos adiposo y cutáneo. Además tienen un rol paracrino y autocrino, ya que actúan como reguladores locales dentro de los folículos en los que son producidos. En la Figura 4 se muestran los diferentes pasos de la biosíntesis de esteroides ováricos, que se detallan a continuación.

### ***1.7.1. Origen del colesterol***

Las hormonas esteroideas pueden clasificarse en base a su principal función biológica en tres clases: progestágenos, andrógenos y estrógenos. Todas ellas son sintetizadas a partir de colesterol derivado de una de estas tres fuentes: (a) colesterol incorporado de la circulación sanguínea, principalmente unido a lipoproteínas; (b) colesterol almacenado dentro de la célula, ya sea como colesterol libre, que forma parte de las membranas celulares, o en forma de ésteres de colesterol encerrados en gotas lipídicas citoplasmáticas; (c) colesterol sintetizado *de novo* en la célula a partir de compuestos de 2 carbonos derivados del metabolismo de carbohidratos, grasas o proteínas. La importancia relativa de cada una de estas rutas varía con la especie, con el tipo celular involucrado y con el estado fisiológico [377].



**Figura 4.** Principales pasos y enzimas en la biosíntesis de esteroides. Adaptado de: **Gore-Langton y Armstrong. (1988).** Follicular steroidogenesis and its control. p.331-385. En: Knobil E., Neill J.D. (eds.). The physiology of reproduction. Raven Press, New York.



El cuerpo lúteo, al igual que la corteza adrenal, tiene una abundante vasculatura y un endotelio capilar altamente permeable, permitiendo un estrecho contacto entre las células luteales y la sangre circulante [87]. Así, el acceso de las grandes moléculas de lipoproteínas a sus receptores en la membrana plasmática de las células luteales se ve facilitado. Por este motivo, el principal sustrato para la biosíntesis de esteroides en estas células es el colesterol unido a la lipoproteína de baja densidad (LDL) o, en algunas especies como la rata, a la lipoproteína de alta densidad (HDL). Sin embargo, en ciertas condiciones, las células luteales también sintetizan colesterol a partir de acetato para utilizarlo en la esteroidogénesis.

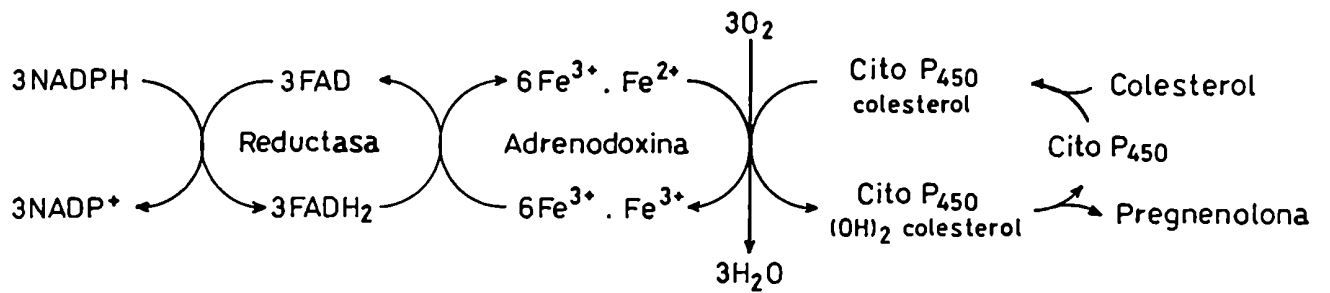
La célula luteal contiene receptores de LDL (o HDL) que están involucrados en el transporte de las lipoproteínas desde el exterior al interior de la célula. El complejo LDL-receptor es internalizado por endocitosis. Las vesículas endocíticas se combinan con lisosomas y el colesterol es liberado. Este colesterol libre abandona el lisosoma para ser luego esterificado y almacenado en gotas lipídicas o utilizado para la biosíntesis de esteroides o incorporado como constituyente de la membrana celular. Se mantiene un equilibrio entre los ésteres de colesterol en sus depósitos intracelulares y el colesterol libre por medio de un balance entre dos enzimas: la colesterol éster sintetasa y la colesterol esterasa, la primera favoreciendo el almacenamiento del colesterol en su forma esterificada y la segunda catalizando su liberación. Las actividades de estas dos enzimas, así como la de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A- reductasa (HMG CoA reductasa), la enzima limitante en la biosíntesis del colesterol, están sujetas a control hormonal, además de estar reguladas por los niveles intracelulares de colesterol [377].

### ***1.7.2. Ruptura de la cadena lateral del colesterol***

El primer paso en la conversión de colesterol a esteroides, y el que generalmente se señala como limitante de la velocidad de la esteroidogénesis [377], es el clivaje de la unión C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub> que da como productos un compuesto de 21 carbonos, la pregnenolona, y un fragmento de 6 carbonos, el aldehído isocaproico. El sistema enzimático que cataliza esta reacción (SCC, por side-chain cleavage) está situado en la cara que da a la matriz de la membrana mitocondrial interna [105]. Es un complejo multienzimático formado por tres componentes: un citocromo P450 (P450<sub>SCC</sub>), que es la oxigenasa terminal (aceptor de electrones), una flavoproteína que contiene flavin adenin dinucleótido (FAD) y una proteína que contiene hierro y azufre, llamada luteodoxina o adrenodoxina, que transporta electrones entre los otros dos componentes [377]. La reacción utiliza NADPH, generado dentro de la mitocondria por oxidación de intermediarios del ciclo de Krebs o de ácidos grasos. Se utilizan tres moles de NADPH y tres de O<sub>2</sub> por mol de colesterol que se convierte en pregnenolona (Fig. 5).

### ***1.7.3. Síntesis de progesterona***

La pregnenolona es el intermediario clave de la biosíntesis de esteroides, común a todas las clases de hormonas esteroideas producidas por el ovario y por otros tejidos esteroidogénicos. Una vez sintetizada, abandona la mitocondria y en el retículo endoplasmático liso es convertida en progesterona por una enzima (o complejo enzimático):  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa: $\Delta^{5-4}$ -isomerasa (3 $\beta$ -HSD). Las actividades de isomerasa y deshidrogenasa no se han podido separar en tejidos esteroidogénicos de mamíferos y parecen funcionar fisiológicamente como una única entidad [142]. La enzima utiliza NAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones y la



**Figura 5.** Esquema de la reacción de ruptura de la cadena lateral del colesterol, mostrando los distintos componentes del complejo enzimático SCC.

reacción es esencialmente irreversible en condiciones fisiológicas. La progesterona, que es el primer compuesto biológicamente activo producido en este camino biosintético, es secretada; la célula luteal tiene una capacidad limitada para almacenar progesterona.

#### ***1.7.4. Síntesis de andrógenos***

El complejo enzimático que cataliza la conversión de progestágenos a andrógenos es la  $17\alpha$ -hidroxilasa: $C_{17,20}$ -liasa. Este sistema enzimático, situado en la membrana del retículo endoplasmático liso, es una oxidasa de función mixta que contiene un citocromo P450 y requiere NADPH y  $O_2$ . La reacción puede utilizar tanto pregnenolona como progesterona como sustratos, resultando en los respectivos productos dehidroepiandrosterona (DHEA) o androstenodiona. Estos dos caminos alternativos son conocidos como vías  $\Delta^5$  y  $\Delta^4$ , respectivamente, aunque se desconoce si está involucrada la misma enzima o enzimas distintas.

#### ***1.7.5. Aromatización de andrógenos***

Los andrógenos androstenodiona y testosterona son convertidos en los estrógenos estrona y  $17\beta$ -estradiol, respectivamente, por un complejo enzimático, ubicado en las membranas del retículo endoplasmático liso, denominado aromatasa. Es también una oxidasa de función mixta que contiene un citocromo P450 y cataliza una reacción en varios pasos, que lleva a la remoción del grupo metilo del carbono 10, seguida por un reordenamiento del anillo A del esteroide hacia una estructura aromática. La reacción requiere NADPH y se consumen tres moles de  $O_2$ .

### ***1.7.6. Metabolismo de la progesterona***

El grupo carbonilo del carbono 20 de los progestágenos puede ser reducido enzimáticamente para dar los correspondientes 20-hidroxi-derivados, generalmente con la configuración 20 $\alpha$ . Las 20-hidroxiesteroide deshidrogenasas son enzimas solubles, que utilizan preferencialmente NADPH como dador de hidrógeno. La 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 $\alpha$ -HSD) del cuerpo lúteo de los roedores está sujeta a regulación hormonal. Esto permite modular la potencia biológica de los progestágenos secretados por el órgano, ya que el producto 20 $\alpha$ -hidroxi-progesterona (20-OH-P), que es el principal metabolito de la progesterona en el ovario de rata, es considerablemente menos activo como progestágeno que su precursor, la progesterona [151].

### ***1.7.7. Regulación de la síntesis y secreción de progesterona***

El factor endócrino más importante que estimula la síntesis y secreción de progesterona en el cuerpo lúteo, independientemente de la especie, parece ser la LH. Esta gonadotropina aumenta la síntesis y secreción de progesterona *in vivo* [293,352] y en incubaciones de tejido o células luteales *in vitro* [18,72,190,363,422]. Esta regulación positiva de la secreción de progesterona puede ser modulada por varios factores de crecimiento.

#### ***1.7.7.1. Receptores de LH***

La presencia de receptores específicos de LH en el ovario fue demostrada inicialmente *in vivo* por la capacidad del órgano de unir LH o hCG marcadas radiactivamente [59]. En estudios posteriores, diseñados para determinar distintas

propiedades del receptor, se utilizaron cortes de tejido, células dispersas, homogenatos, fracciones particuladas o membranas aisladas de cuerpo lúteo. Ha sido ampliamente demostrado que la LH y la hCG compiten por el mismo receptor específico, localizado en la membrana plasmática de las células blanco. La hCG es la más frecuentemente utilizada para la determinación de receptores, ya que puede ser radioiodinada con una actividad específica más alta, la  $^{125}\text{I}$ -hCG es más estable que la  $^{125}\text{I}$ -LH y presenta una unión inespecífica menor. Sin embargo, se ha establecido que el tiempo requerido para la respuesta esteroidogénica, la internalización del complejo hormona-receptor y la movilidad lateral en la membrana de los receptores ocupados son diferentes para LH y hCG [294].

Recientemente, fue clonado el gen que codifica para el receptor de LH de rata [251], cerdo [235] y humano [183,261]. La molécula consta de un péptido señal de 26 a 27 aminoácidos, un dominio extracelular N-terminal que contiene el sitio de unión a la hormona, siete putativos dominios transmembrana y una cola citoplasmática C-terminal, responsable de la activación de una proteína G. El dominio transmembrana y la cola citoplasmática muestran homología de secuencia con otros receptores que activan proteínas G.

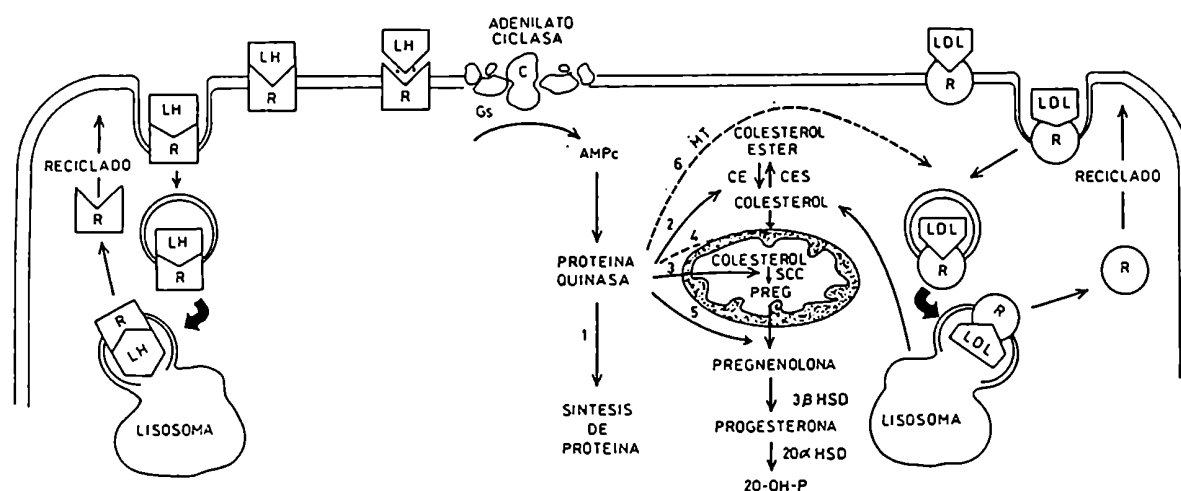
La observación de que menos del 1% de los receptores de LH en el ovario están ocupados en condiciones de máxima secreción de esteroides [88] ha llevado al concepto de receptores de reserva ("spare receptors") para esta hormona trófica. Sin embargo, parece poco probable que estos receptores sean realmente "de reserva", ya que los niveles circulantes de LH son tan bajos (0,5-1,5 ng/ml) que este gran número de receptores se requeriría para asegurar que un número suficiente de ellos esté ocupado por la hormona para estimular la esteroidogénesis.

Una variedad de factores puede afectar la concentración de receptores de LH en el cuerpo lúteo [325], pero el más importante parece ser la propia LH. En efecto, la exposición de tejido luteal a altas concentraciones de LH o hCG resulta en una pérdida dramática (hasta 90% en algunos casos) de los receptores de LH, llamada regulación negativa ("down-regulation") [68,69,150,320,384]. Este fenómeno es dependiente de la dosis y del tiempo y va acompañado por una pérdida concomitante de la actividad de adenilato ciclasa y la producción de esteroides estimuladas por hCG [57,150]. Involucra la internalización del complejo hormona-receptor [62] y sería un proceso degradatorio más que un mecanismo de acción de la hormona [20]. Evidencias recientes en rata han indicado que una producción disminuida del ARNm del receptor también contribuye a la regulación negativa del receptor de LH [167].

#### *1.7.7.2. Efecto de la LH sobre la esteroidogénesis*

La unión de la LH a su receptor en cuerpo lúteo promueve la activación de la adenilato ciclasa por una proteína reguladora que une GTP [246], del tipo estimuladora (Gs) (Fig. 6). El receptor ocupado por la hormona interactúa con Gs promoviendo la unión de GTP a esta última, a través de un proceso dependiente de  $Mg^{++}$  que resulta en la activación de la Gs. La proteína activada estimula al componente catalítico de la adenilato ciclasa, lo que resulta en la conversión de ATP- $Mg^{++}$  en AMPc. Gs tiene actividad intrínseca de GTPasa y convierte el GTP unido a ella en GDP, inactivando a la proteína, a menos que haya disociación del GDP y unión de otra molécula de GTP.

El AMPc producido se une a la subunidad reguladora de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) [113,287] o es degradado a 5'AMP por una fosfodiesterasa (PDE) de AMPc [246]. La unión del AMPc a la subunidad reguladora



**Figura 6.** Representación esquemática de los eventos intracelulares involucrados en la estimulación de la esteroidogénesis por la LH. La LH se une a su receptor en la membrana plasmática y activa a la adenilato ciclasa, lo que produce un aumento en los niveles intracelulares de AMPc y la activación de la proteína quinasa A (PKA). La PKA activada (1) estimula la síntesis proteica; (2) activa la colesterol esterasa (CE); (3) puede estimular el transporte de colesterol a la mitocondria o (4) de la membrana externa a la interna mitocondrial; (5) puede estimular el transporte de pregnenolona hacia afuera de la mitocondria; (6) puede estimular la incorporación de LDL (o HDL), aumentando el colesterol como sustrato. De: **Niswender y Nett** [292].



de la PKA promueve la disociación de la subunidad catalítica de esta enzima. Esta subunidad activada cataliza la fosforilación de sustratos endógenos, activando o inhibiendo a estos reguladores. Consecuentemente, se ha generado una respuesta biológica. Estas respuestas pueden ser revertidas por desfosforilación de los sustratos por fosfatasas [212]. Está generalmente aceptado que todos los efectos intracelulares del AMPc son mediados por la PKA [213].

La proteína quinasa activada puede influir sobre la función de la célula luteal a través de varios mecanismos. Por un lado, las quinasas de proteínas pueden influenciar eventos nucleares, expresión génica y síntesis de proteínas [186], incluyendo enzimas esteroidogénicas y una proteína que une colesterol [364], o pueden aumentar la síntesis proteica por fosforilación de ribosomas [21]. Por otra parte, se ha demostrado que la colesterol esterasa se activa por fosforilación mediada por PKA [50,395]. En cuanto al transporte del colesterol a la mitocondria y de la pregnenolona hacia afuera de ella, se sabe que involucra microfilamentos [143], cuya polimerización y actividad se ven modificadas por proteínas quinasas. Finalmente, la internalización y el transporte de los receptores de lipoproteínas a los lisosomas estaría regulado por la PKA [292].

En células luteales se han identificado proteínas ligadoras de colesterol y pregnenolona [103,379]. Estas moléculas ayudarían al transporte de esteroides, muy poco solubles en medio acuoso, dentro de la célula; por otra parte, acotarían la gran inhibición por producto que sufren todas las enzimas esteroidogénicas en el cuerpo lúteo [166]. Debido a que la síntesis de proteínas es esencial para la respuesta esteroidogénica [108,123,260,354] y a que la o las proteínas sintetizadas tienen una vida media muy corta [354], es posible que estas proteínas sean transportadores de esteroides. Parecería que la síntesis proteica es necesaria para el transporte del

colesterol al citocromo P450<sub>SCC</sub> y que éste sería uno de los mecanismos involucrados en la estimulación de la secreción de progesterona en cuerpo lúteo por LH [156].

En 1975, se sugirió que la PKA activaría el complejo enzimático de ruptura de la cadena lateral del colesterol (SCC) [55], pero evidencias más recientes indican que la actividad de esta enzima no está regulada por la PKA [177,423]. Actualmente se sugiere que el transporte del colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna es el paso limitante de la velocidad de la esteroidogénesis [127,364]. La participación de la PKA en este proceso no es clara.

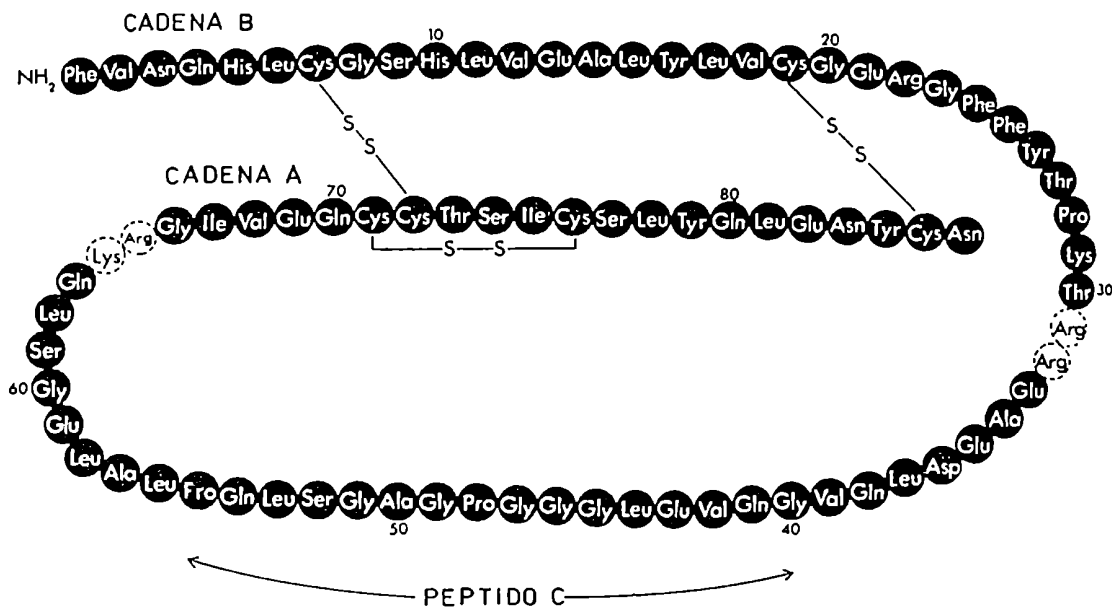
La síntesis de enzimas como la SCC y la 3 $\beta$ -HSD no parece estar involucrada en la respuesta aguda a hormonas estimuladoras, ya que por ser proteínas integrales de membrana, su recambio es muy lento [51,210]. Sin embargo, la síntesis de estas dos enzimas podría esperarse como parte de la respuesta crónica a la LH. La síntesis de las tres proteínas que forman el complejo SCC se induce en respuesta a FSH o AMPc en células de granulosa de rata [396]. Rogers *et al.* [333] demostraron que los ARNm que codifican para la adrenodoxina y el P450<sub>SCC</sub> aumentan coordinadamente en tejido luteal bovino desde la ovulación hasta la fase lútea tardía y que luego disminuyen abruptamente durante la luteólisis. En forma similar se comporta el ARNm de la 3 $\beta$ -HSD en cuerpo lúteo bovino y ovino [73,153].

## 2. LA INSULINA

### 2.1. Estructura, síntesis y secreción de insulina

Las investigaciones sobre la insulina comenzaron hace más de un siglo. En 1889, von Mering y Minkowski mostraron que la diabetes mellitus, un desorden metabólico en el que se encontraba excreción urinaria de azúcar y altos niveles sanguíneos de la misma, podía ser inducida por pancreatometomía [413]. Se concluyó entonces que el páncreas elabora una sustancia que regula los niveles de azúcar en sangre y restablece los parámetros metabólicos normales. Sin embargo, debieron pasar 33 años hasta que Banting y Best [30] lograran aislar la hormona, que fue luego cristalizada por Abel [2]. En 1955, Sanger y colaboradores [343] utilizaron la insulina para obtener lo que sería la primera dilucidación de la secuencia aminoacídica de una proteína. La síntesis química de la hormona (1963-1965) confirmó plenamente la estructura descrita por Sanger y luego se describió también su conformación tridimensional [4].

La insulina es una hormona polipeptídica, de cuya síntesis, almacenamiento y secreción son responsables las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas. La molécula de insulina tiene un peso molecular de 6000 y está constituida por dos cadenas: la A, de 21 aminoácidos y un puente disulfuro que une sus aminoácidos 6 y 11, y la B, de 30 aminoácidos. Ambas cadenas están unidas por dos puentes disulfuro, ubicados entre los aminoácidos  $A_7$  y  $B_7$  y  $A_{20}$  y  $B_{19}$ , respectivamente (Fig. 7).



**Figura 7.** Secuencia de aminoácidos de la proinsulina humana. Los residuos básicos indicados en círculos abiertos son el sitio de clivaje en la conversión de proinsulina a insulina y se eliminan en este proceso. Así se generarán la insulina, con sus cadenas A y B, y el péptido C. De: **Oyer et al. (1971).** Studies on human proinsulin. Isolation and amino acid sequence of the human pancreatic C-peptide. *J.Biol.Chem.* 246:1375-1386.

La insulina es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso de las células  $\beta$ , en la forma de un precursor constituido por una única cadena con un mayor número de aminoácidos que la insulina madura, y por lo tanto de mayor peso molecular (alrededor de 11.500), denominado preproinsulina. Este precursor sufre luego el clivaje de unos 20 aminoácidos de su extremo amino-terminal, dando lugar a la proinsulina, de peso molecular 9000 y constituida por 81 a 86 aminoácidos, según la especie estudiada. Esta molécula contiene las dos cadenas de la insulina, la B en el extremo amino-terminal y la A, en el carboxi-terminal, unidas por una tercer cadena, llamada C; contiene también los tres enlaces disulfuro en las mismas posiciones que en la insulina (Fig. 7). La conversión a insulina ocurre en las cisternas del aparato de Golgi por acción de endopeptidasas que escinden el péptido C. Ambos productos de esta proteólisis (insulina y péptido C) son empaquetados en gránulos citoplasmáticos, donde cristalizan con  $Zn^{++}$  en una disposición ordenada, para ser luego secretados por las células  $\beta$  en respuesta a cambios en la concentración plasmática de glucosa [137].

## **2.2. Efectos metabólicos de la insulina**

Dada la multiplicidad de procesos sobre los que actúa la insulina, tanto a tiempos cortos como a tiempos largos, se los ha clasificado en dos grandes grupos: los que estimulan la síntesis de ADN se denominan efectos de crecimiento, mientras que los que involucran cambios en la síntesis o degradación de proteínas o cambios en la actividad de enzimas preexistentes y transportadores de glucosa a través de membrana reciben el rótulo de metabólicos.

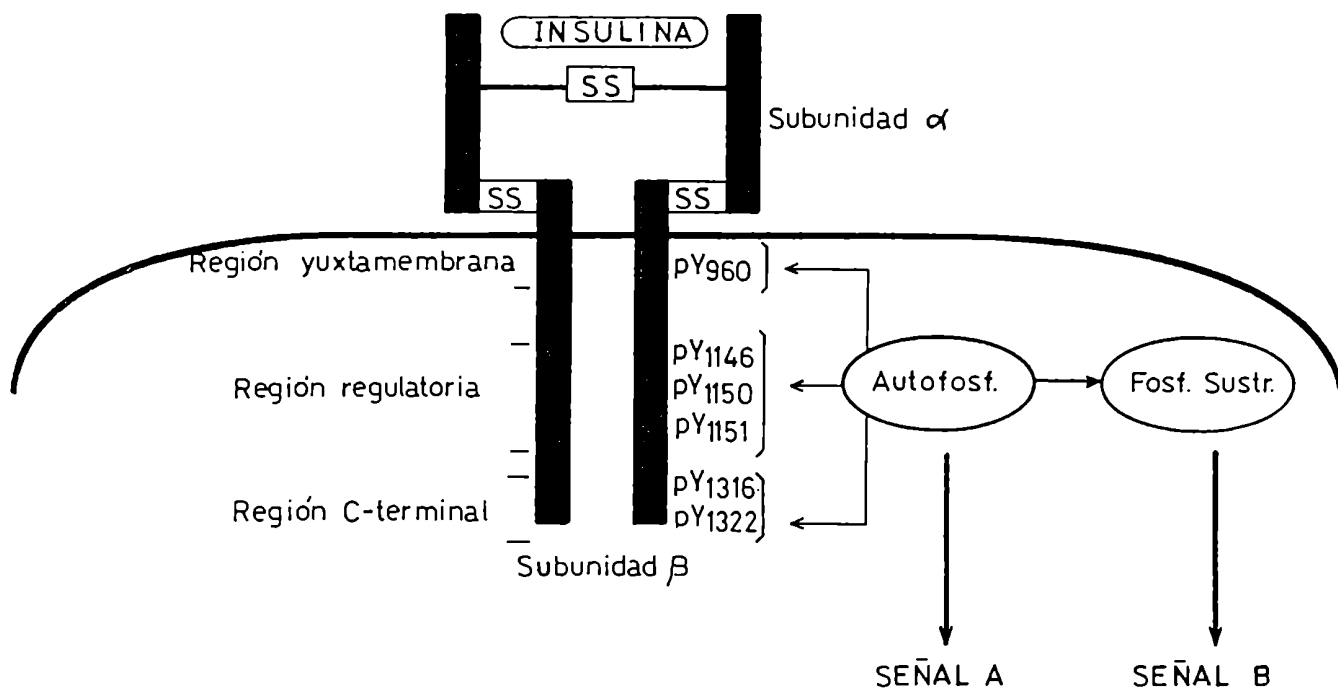
La insulina puede ser considerada como una hormona anabólica, que interviene en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y

proteínas. La hormona estimula la entrada y utilización de glucosa en células musculares y adipocitos; en músculo, la mayor parte de la glucosa incorporada es convertida en glucógeno, mientras que en adipocitos es convertida en glicerol y ácidos grasos. Además, inhibe la lipólisis, la gluconeogénesis y la glucogenólisis y activa el almacenamiento de glucógeno y la síntesis de triacilglicerol en hepatocitos. Por otra parte, estimula el transporte de aminoácidos y iones y modula la actividad de un gran número de enzimas. Entre las enzimas activadas por insulina se encuentran la glucógeno sintetasa, acetil CoA carboxilasa, piruvato quinasa, piruvato deshidrogenasa, glucoquinasa, fosfodiesterasa, tirosinamino transferasa y lipoproteína lipasa, mientras que la piruvato carboxilasa, fosforilasa, fosforilasa quinasa, triacilglicerol lipasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa son inhibidas por la hormona [84].

### **2.3. Características del receptor de insulina**

El primer evento en la interacción de la insulina con sus tejidos efectores es la unión de la hormona a un receptor específico, situado en la membrana plasmática de las células blanco. Este receptor es un heterotetrámero formado por dos subunidades  $\alpha$ , de peso molecular 135.000 y dos subunidades  $\beta$ , de peso molecular 95.000, unidas por puentes disulfuro (Fig. 8). Ambas subunidades están glicosiladas [116,154,334] y aunque no se conoce la función exacta de los carbohidratos presentes en la molécula, se sabe que la remoción de galactosa y ácido siálico o de manosa por exoglicosidasas causa una disminución de la unión de insulina [53,181].

Las subunidades  $\alpha$  son completamente extracelulares y contienen el dominio de unión a insulina, mientras que las subunidades  $\beta$  están compuestas por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática de 402



**Figura 8.** Modelo del receptor de insulina y de los posibles mecanismos de señalización intracelular. SS: puentes disulfuro, pY: fosfotirosina. De: Myers y White [281].

aminoácidos [402]. Este dominio intracelular contiene una proteína quinasa específica de tirosina, similar a las de ciertos productos de proto-oncogenes celulares (como p60<sup>c-src</sup> y c-ros) y a los receptores de algunos factores de crecimiento peptídicos (como PDGF y EGF) [146,402].

El receptor de insulina es sintetizado a partir de un prorreceptor, compuesto por una única cadena de peso molecular 180.000 en su forma no glicosilada y que contiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  del receptor. Este precursor, una vez glicosilado, contiene las dos actividades del receptor maduro: es capaz de unir insulina, al igual que la subunidad  $\alpha$  [85] y se autofosforila en presencia de la hormona, una propiedad de la subunidad  $\beta$  del receptor [321]. El prorreceptor sufre glicosilación y clivaje en el aparato de Golgi y las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  maduras se insertan en la membrana plasmática para formar el receptor tetramérico funcional.

#### **2.4. Internalización del complejo hormona-receptor**

La unión de la insulina a su receptor desencadena una migración de receptores hacia regiones especializadas de la membrana plasmática, denominadas "coated pits" (pozos recubiertos) [56]. Estos son invaginaciones de la membrana, revestidas en su cara citoplasmática por la proteína clatrina. El complejo insulina-receptor es endocitado en vesículas recubiertas, que luego se fusionan con lisosomas; el pH ácido de estos últimos promueve la disociación del complejo ligando-receptor [188,414,425].

Existen entonces dos posibilidades, tanto para la insulina como para el receptor: pueden ser reciclados nuevamente a la membrana celular o degradados



dentro de los lisosomas. La importancia relativa de estos dos procesos varía en distintos tipos celulares. Por ejemplo, el principal mecanismo por el cual la insulina es depurada de la circulación es la endocitosis mediada por receptor en hepatocitos, donde el destino mayoritario de la hormona es la degradación [112,370]. Por el contrario, las células endoteliales tienen un rol importante como transportadores de insulina hacia el exterior de los capilares; la hormona es endocitada en la membrana luminal y luego retroendocitada a través de la membrana serosa, mecanismo que se conoce como transcitosis [243]. Además, en muchos tipos celulares, la endocitosis del receptor estimulada por insulina resulta en una degradación aumentada del receptor y una disminución del número de receptores sobre la superficie celular, a través de un proceso llamado "down regulation" (regulación negativa) [126,193].

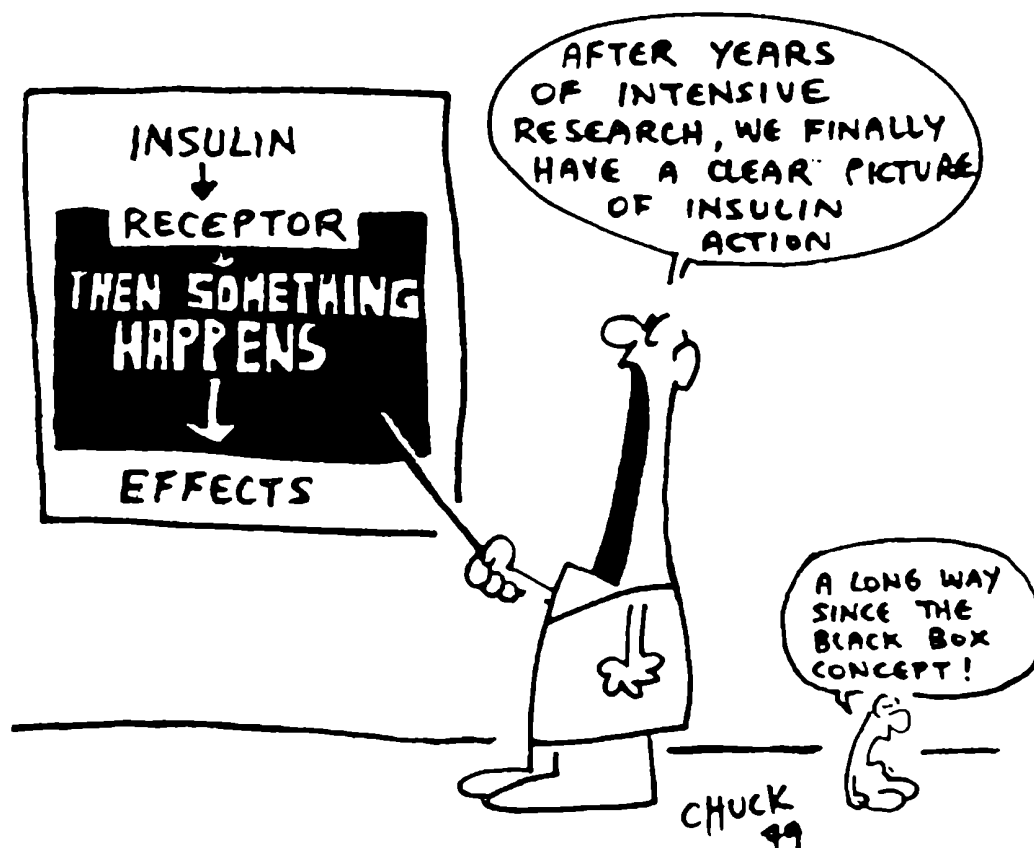
Ciertas evidencias sugieren que la internalización de la insulina y su receptor puede tener un papel en algunas acciones de la hormona, pero no en otras. La inhibición de la internalización de la hormona en adipocitos bloquea la activación por insulina del transporte de glucosa [399]. En acinos pancreáticos, agentes que impiden el procesamiento intracelular de la hormona también bloquean el transporte de glucosa estimulado por insulina, pero no la estimulación de la síntesis proteica [180,318]. Además, la inhibición del procesamiento de insulina en hepatocitos bloquea la regulación del metabolismo de glucógeno, pero no de la degradación proteica [94,306]. Se ha propuesto también que en el caso de la insulina, la endocitosis mediada por receptor tendría la función de controlar el número de receptores en la membrana plasmática o que la internalización ubicaría a la proteína quinasa del receptor de insulina en un entorno donde podría actuar sobre sustratos intracelulares [189].

## 2.5. Mecanismo de acción de la insulina

A pesar de que la insulina fue aislada hace más de 70 años, de que fue la primera proteína secuenciada y de que muchos de sus efectos sobre distintos caminos metabólicos han sido ampliamente descritos, el mecanismo por el cual esta hormona regula diferentes procesos celulares no ha podido ser completamente dilucidado hasta el momento.

El dibujo que se muestra en la Figura 9 resume las frustraciones de los investigadores que estudiaban la acción de la insulina hacia el final de los años '70. Sin embargo, poco después se abrió una brecha fundamental al descubrirse que tanto el receptor de insulina [194] como el de EGF [404] eran tirosinas quinasa. Desde entonces, y en particular en los últimos años, se han hecho grandes avances en este campo y son pocas las piezas que faltan en el rompecabezas que abarca desde el receptor en la membrana plasmática hasta los puntos más distales involucrados en la señal intracelular .

Se sabe que la unión de la insulina a su receptor activa inmediatamente a la tirosina quinasa de la subunidad  $\beta$  del receptor, lo que resulta en la autofosforilación de residuos tirosina en tres regiones, la región yuxtamembrana, la región regulatoria y la región carboxi-terminal [106,282,420] (Fig. 8). La actividad de tirosina quinasa del receptor es crucial para la acción de la hormona; mutaciones espontáneas del receptor de insulina que inhiben la actividad de quinasa y bloquean la autofosforilación están asociadas con resistencia insulínica severa [263,297]. Además, mutaciones puntuales del receptor que destruyen el sitio de unión de ATP (y en consecuencia bloquean la actividad de quinasa) también suprimen la acción de la insulina en cultivos celulares [64,97,250]. Por lo tanto, parece claro que la autofosforilación estimulada por



**Figura 9.** Caricatura publicada por Trends in Biochemical Sciences en 1979 que resume las frustraciones de los científicos que investigaban acerca de la acción de la insulina en ese tiempo.

insulina o la fosforilación subsecuente de otras proteínas por el receptor de insulina activado son el evento clave para la transmisión de la señal hormonal.

En la Figura 8 se muestran dos modelos posibles de transducción de la señal de la insulina. Uno de ellos sugiere que la autofosforilación en tirosina causa un cambio conformacional en la subunidad  $\beta$  del receptor [309], facilitando la interacción del receptor con elementos celulares responsables de la señalización. Este modelo es el que se acepta para los receptores de EGF y PDGF, que una vez fosforilados en tirosina, interaccionan con la fosfolipasa C (PLC)- $\gamma$ , con la proteína activadora de la GTPasa del oncogen *ras* (GAP), con Src y tirosinas quinasas similares a Src, con la proteína quinasa Raf, con GRB2 (por growth factor receptor-bound protein 2) y con la fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa [47,74,191,196-198,214,259,264,273-275,381].

Todas estas proteínas, y otras proteínas citoplasmáticas involucradas en señalización, contienen un segmento de unos 100 aminoácidos, el dominio SH2 (por Src homology 2), que tiene un papel central en las interacciones con receptores que son tirosinas quinasas [209]. Los dominios SH2 tienen la capacidad de unirse fuertemente a fosfotirosinas flanqueadas por una secuencia aminoacídica específica [52,249]. La autofosforilación, inducida por unión del ligando, de los receptores de algunos factores de crecimiento actúa como un interruptor para crear sitios de unión para los dominios SH2 de proteínas citoplasmáticas [15]. Las proteínas con dominios SH2 poseen frecuentemente una secuencia distinta, de unos 50 aminoácidos, el dominio SH3, que también está implicado en interacciones proteína-proteína durante la transducción de señales [65]. Se ha sugerido que estos dominios estarían involucrados en el control de proteínas que unen GTP (proteínas G) pequeñas, del tipo de Ras [305].

Sin embargo, no se ha podido demostrar una asociación directa de éstas u otras moléculas con el receptor de insulina. Además, en contraste con los receptores de PDGF y EGF, la quinasa del receptor de insulina se activa por autofosforilación [296,421], sugiriendo que la señal de la hormona podría generarse por fosforilación de alguna otra molécula. Estas evidencias, y otras que se describen más adelante, apoyan el segundo modelo de la Figura 8, es decir la participación de un sustrato endógeno de la tirosina quinasa del receptor de insulina como generador de la señal de la hormona.

### ***2.5.1. El principal sustrato del receptor de insulina: IRS-1***

En muchos tipos celulares, la principal proteína, además de los mismos receptores, que se fosforila en tirosina en respuesta a insulina o IGF-I, pero no a EGF o PDGF, es una proteína citoplasmática de 185 kDa, denominada IRS-1 (por sustrato del receptor de insulina 1) [199,219]. Esta proteína, cuya secuencia aminoacídica no muestra identidad con ninguna otra proteína conocida [382], tiene 30 sitios potenciales de fosforilación en serina y treonina y 20 en tirosina [291,383]. Antes de estimular las células con insulina, IRS-1 presenta fosforilación intensa en serina y débil en treonina. Luego de la estimulación por insulina, se produce un aumento de la fosforilación en serina y tirosina de IRS-1 [382].

Existen dos evidencias importantes que confirman que IRS-1 media las acciones de la insulina. Por un lado, la incorporación de timidina al ADN en respuesta a la insulina es dos veces mayor en células CHO transfectadas con IRS-1 de rata que en células control [382]. Por otra parte, IRS-1 recombinante inyectado en ovocitos de *Xenopus* se fosforila en tirosina luego de la estimulación con insulina o IGF-I y la mayoría de los ovocitos inyectados con IRS-1 madura en respuesta a dicha

estimulación, mientras que los ovocitos no inyectados no lo hacen [305]. Este hallazgo no sólo confirma el papel de IRS-1 en la señalización de la insulina y el IGF-I, sino que involucra a esa proteína en el control del ciclo celular.

Ha sido demostrado también que, una vez fosforilada en tirosina, IRS-1 se asocia con alta afinidad a proteínas con dominios SH2, como PI-3-quinasa, GRB2 y SHPTP2 (por SH2-containing protein-tyrosine-phosphatase 2) [23,117,383].

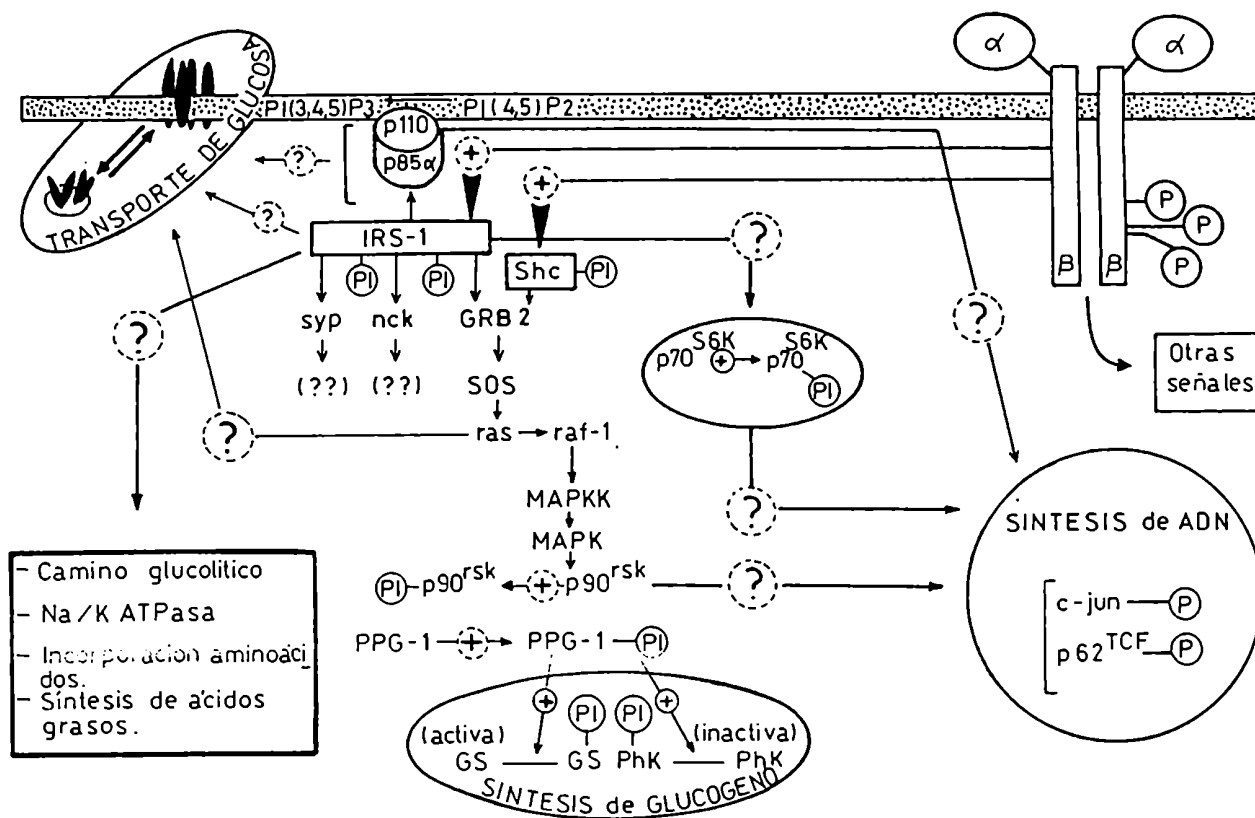
La PI-3-quinasa es una enzima que cataliza la fosforilación de PI, PI 4-fosfato y PI 4,5-difosfato en la posición 3 del anillo del inositol. La enzima está formada por una subunidad catalítica de 110 KDa (p110) y una regulatoria de 85 KDa (p85) [302]. La subunidad regulatoria posee un dominio SH3 y dos dominios SH2, que median la unión de la enzima a fosfotirosinas de IRS-1 y de los receptores de PDGF y EGF [74,196,223,224]. Esta asociación activa a la enzima, produciéndose una rápida elevación de los niveles celulares de PI 3,4-difosfato y PI 3,4,5-trifosfato [342]. No se ha establecido aún si los PI 3-fosfatos participan en la señalización hormonal, y si así fuera, se ignora cuál es su mecanismo de acción. Por otra parte, se ha propuesto que p85 podría actuar como "adaptador", conectando a IRS-1 con otros elementos involucrados en la transmisión de la señal de la insulina [281].

GRB2 es el homólogo humano de Sem5, una pequeña proteína de estructura SH3-SH2-SH3, que conecta un receptor tirosina quinasa con el camino de Ras en el nematodo *Caenorhabditis elegans* [65]. Recientemente, se ha demostrado que GRB2 es el nexo entre el receptor de insulina fosforilado y la ruta de señalización de Ras [29,367]. Con este hallazgo, se habría completado la cadena de eventos que va desde la unión de la insulina a su receptor en la membrana plasmática hasta la activación de la transcripción de genes específicos en el núcleo celular.

El modelo completo sería el que se describe en la Figura 10. Luego de la estimulación con insulina, GRB2 se une a IRS-1 fosforilado en tirosina, a través de su dominio SH2 [24,280,307,341,383], y a una proteína, denominada mSOS [homóloga a la proteína de *Drosophila* Son-of-sevenless (Sos)], a través de sus dominios SH3 [367]. Sos forma parte de un grupo de proteínas que son intercambiadores de nucleótidos de guanina y que activan a Ras forzándolo a liberar el GDP que tiene unido y a unir una molécula de GTP, formándose el complejo Ras-GTP, que es la forma activa de todas las proteínas G [45,46,107]. No se sabe aún cómo la unión de GRB2 a IRS-1 potencia la habilidad de GRB2 de activar a Sos. Una posibilidad es que esta interacción repositone a Sos cerca de Ras, que está en la membrana plasmática. Como sustento de esta hipótesis, se ha descrito que IRS-1 se localiza en la membrana plasmática en células estimuladas con insulina [382]. Alternativamente, la unión de GRB2 a IRS-1 puede causar un cambio conformacional en el primero, que promueva la activación de Sos.

La forma activa de Ras (Ras-GTP) a su vez activa a Raf (una serina/treonina quinasa citoplasmática), probablemente a través de una asociación física de ambas moléculas [267,406,416,433], y Raf fosforila y activa a otra quinasa, denominada MAP (proteína activada por mitógenos) quinasa quinasa [171,174,215]. Esta última fosforila en treonina y tirosina a una tercera quinasa, la MAP quinasa [43,289], que, a través de la fosforilación de factores de transcripción en el núcleo de la célula [175], controlaría la expresión de genes específicos.

Por otra parte, la MAP quinasa activaría, a través de un paso intermedio, a una fosfatasa: la PPG-1 (proteína fosfatasa asociada a glucógeno 1), que es, no solamente la enzima más importante en extractos de músculo que defosforila y activa a la glucógeno sintetasa, sino también la principal enzima que inactiva a las enzimas



**Figura 10.** Esquema de la potencial red de caminos de señalización de la insulina, mediados a través de la activación de la proteína quinasa del receptor de insulina y de la fosforilación del IRS-1. MAPK: MAP quinasa; MAPKK: MAP quinasa quinasa; syp: SHPTP2; nck: oncoproteína con dominios SH2; S6K: quinasa S6; GS: glucógeno sintetasa; PhK: fosforilasa quinasa; P: fosfato. Adaptado de: **White y Kahn. (1994).** The insulin signaling system. *J.Biol.Chem.* 269:1-5.



regulatorias de la glucogenólisis (glucógeno fosforilasa y fosforilasa quinasa) [66,178,179]. Por lo tanto, los efectos pleiotrópicos de la insulina estarían mediados por la interacción de IRS-1 con enzimas o moléculas adaptadoras que contienen dominios SH2, tal como se resume en la Figura 10.

## 2.6. Factores de crecimiento semejantes a la insulina

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs) son una familia de péptidos estrechamente relacionados con la hormona. Se postula que una duplicación génica aproximadamente 600 millones de años atrás originó, a partir de un precursor común, dos moléculas distintas: insulina e IGF [118]. Los IGFs son factores de crecimiento polipeptídicos de bajo peso molecular y, al igual que la proinsulina, están compuestos por una única cadena que contiene tres puentes disulfuro [328,329].

De acuerdo a su carga neta, los IGFs pueden ser divididos en dos grupos diferentes. El IGF-I, también conocido como somatomedina-C, es un péptido básico (punto isoelectrico  $8,5 \pm 0,5$ ), de peso molecular 7649, formado por 70 aminoácidos y que presenta un 43% de homología con la proinsulina humana. Tiene un potente efecto promotor del crecimiento, tanto *in vivo* como *in vitro* y su concentración plasmática depende fundamentalmente de la hormona de crecimiento (GH). El hígado es la principal fuente del IGF-I circulante, pero también se sintetiza en otros tejidos, entre ellos el ovario [132].

El IGF-II es un péptido neutro (punto isoelectrico  $6,2 \pm 0,5$ ), que presenta un 50% de homología con el IGF-I y que está compuesto por 67 aminoácidos, con un peso molecular de 7471. También se sintetiza en varios tejidos, pero su concentración

plasmática parece ser mucho menos dependiente de la GH y sus efectos sobre el crecimiento son menos relevantes que los del IGF-I. Por el contrario, tiene más actividad similar a la insulina que el IGF-I y es considerado el IGF más importante para el crecimiento y desarrollo fetales. Además, por estar presente en altas concentraciones en el sistema nervioso central, podría tener algún rol en su desarrollo.

Los IGFs ejercen sus acciones fisiológicas interactuando con receptores específicos en la membrana plasmática, llamados receptores de tipo I y de tipo II, que unen preferentemente IGF-I e IGF-II, respectivamente [340]. Ambos IGFs se unen al receptor de insulina, aunque con baja afinidad.

El receptor de tipo I tiene, en la mayoría de los tejidos, mayor afinidad por IGF-I que por IGF-II y une insulina con moderada afinidad. Su estructura está estrechamente relacionada con la del receptor de insulina; ambos son glicoproteínas tetraméricas de idéntico peso molecular, compuestas por dos subunidades  $\alpha$ , extracelulares y que contienen el sitio de unión al ligando, y dos subunidades  $\beta$ , que atraviesan la membrana y tienen, en su porción citoplasmática, actividad de tirosina quinasa; las distintas subunidades están unidas por puentes disulfuro [403]. El camino de transducción de la señal hormonal es el mismo que para la insulina, es decir a través de IRS-1.

El receptor de IGF de tipo II es distinto al de tipo I y al de insulina. Tiene alta afinidad por el IGF-II, una afinidad más baja por el IGF-I y no une insulina. Es una glicoproteína de cadena única, que expone el 90% de su estructura al medio extracelular y que posee un único dominio transmembrana [271]. El análisis de la secuencia del ADNc del receptor muestra que es virtualmente idéntico al receptor de

manosa-6-fosfato (M6P) independiente de cationes [271]. El receptor de IGF tipo II/M6P tiene sitios de unión para IGF-II y para M6P [336] y su principal función es la de dirigir hidrolasas ácidas hacia los lisosomas. Se ha sugerido que este receptor activaría canales de calcio a través de su asociación con una proteína  $G_{12}$  [290].

El alto grado de homología entre las estructuras primarias de la insulina y los IGFs y las similitudes en sus estructuras terciarias permiten que los IGFs interactúen con el receptor de insulina y que la insulina se una al receptor de IGF-I. De hecho, en gran cantidad de tejidos y sistemas celulares se ha demostrado que los IGFs ejercen su actividad metabólica a través del receptor de insulina, mientras que la insulina expresa su actividad mitogénica a través del receptor de IGF de tipo I [131].

Los IGFs, a diferencia de la insulina, circulan unidos a proteínas transportadoras, en forma de complejos de alto peso molecular. Estas proteínas transportadoras, llamadas IGFBPs (por IGF binding proteins), se han identificado tanto en suero como en varios fluidos corporales y se especula que su función sería, por un lado, aumentar la vida media de los factores, y por otro, regular su acción en los diferentes tejidos [335]. Se han identificado hasta el momento 6 IGFBPs diferentes, de las cuales ninguna es capaz de unir insulina.

## 2.7. Diabetes

La diabetes mellitus es el más antiguo desorden endócrino conocido. Fue mencionada en el papiro de Ebers, en Egipto, aproximadamente 1500 años antes de Cristo y Aretaeus de Cappadocia la caracterizó y le dio el nombre de *diabetes* (del griego "sifón", por el gran volumen de orina excretado) en el primer siglo de la Era Cristiana. Sin embargo, recién en el siglo XVII, el médico inglés Willis descubrió la

presencia de una sustancia dulce y pegajosa en la orina. Como la miel era la única sustancia de esas características conocida entonces, la enfermedad recibió el nombre de diabetes *mellitus*. Pasaron cientos de años hasta que se identificó a la glucosa en la orina de los diabéticos y recién en 1889 se estableció la vinculación de la diabetes con el páncreas [244].

Hace aproximadamente 3000 años, el médico hindú Sushruta reconoció la existencia de dos tipos de diabetes, uno de tendencia familiar y que comenzaba en la juventud y otro atribuido al uso de una dieta desequilibrada. A través de los siglos, los médicos han coincidido en que el cuadro clínico, el curso y la severidad de la diabetes siguen usualmente dos patrones generales. En los últimos veinte años se ha establecido claramente que estos dos patrones clínicos del síndrome diabético son probablemente entidades distintas, en términos de etiología, patogénesis, presentación clínica y estrategias de tratamiento [368]. La Organización Mundial de la Salud los ha clasificado como diabetes mellitus insulino-dependiente o tipo I y diabetes mellitus no insulino-dependiente o tipo II [1]. Es indudable que dentro de cada uno de estos grupos debe haber heterogeneidad, con un espectro de subtipos, algunos de los cuales ya han sido bien estudiados.

La diabetes tipo I se caracteriza por alteraciones severas en los islotes pancreáticos, por una deficiencia de la secreción endógena de insulina, insulinopenia, tendencia a la cetosis y una dependencia de la administración diaria de insulina para el mantenimiento de la vida. En algunos pacientes se observa la destrucción de las células de los islotes, presumiblemente como consecuencia de una respuesta autoinmune [368]. Debido a la deficiencia insulínica, la homeostasis de glucosa está permanentemente alterada y se generan complicaciones severas: cetoacidosis, mortalidad perinatal, ceguera, nefropatía y anomalías vasculares [247].

La diabetes tipo II se caracteriza por presentar secreción pancreática de insulina, aunque con una dinámica secretoria alterada, ausencia de cetosis y resistencia insulínica, debida a una respuesta disminuida de las células blanco a la hormona. En pacientes con este tipo de diabetes, en su gran mayoría obesos, se observa un amplio rango de respuesta insulínica a la glucosa, desde baja a supranormal [368].

## **2.8. Insulina y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos**

A pesar de que en los últimos 10 años se han descubierto y analizado nuevas rutas de señalización intracelular, los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) siguen siendo los segundos mensajeros mejor caracterizados, y su papel en la diferenciación y el control de numerosos procesos metabólicos de las células está ampliamente aceptado.

Una vez que los nucleótidos cíclicos son sintetizados por sus respectivas ciclasas, en parte se unen y activan proteínas quinasas específicas y en parte son degradados por las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs) a 5'-AMP o 5'-GMP. Por lo tanto, las PDEs son responsables de la inactivación del mensaje de los nucleótidos cíclicos.

La caracterización de la actividad de PDE extraída de varios tejidos llevó al descubrimiento de que en células de mamíferos se expresan múltiples formas de PDE. Se las ha clasificado en familias, de acuerdo a algunos parámetros definidos: afinidad por AMPc y GMPc, sensibilidad al complejo  $Ca^{++}$ -calmodulina, sensibilidad a distintos inhibidores.

Las PDEs son enzimas que están sujetas a regulación hormonal. Dentro de los estímulos que modulan la actividad de las PDEs se encuentra la insulina. En varios sistemas, la insulina bloquea tanto la lipólisis como el transporte de ácidos grasos por un mecanismo que involucra la activación de una PDE. Por otra parte, en ovocitos de *Xenopus*, la insulina estimula la hidrólisis del AMPc y promueve la reanudación de la meiosis. Resulta interesante que la inyección de proteína ras activada en estos ovocitos también activa la hidrólisis de AMPc.

En cuanto al mecanismo de activación de la PDE, se ha descrito que la enzima se fosforila, en presencia de insulina, en un residuo de serina y que esta fosforilación es responsable de su activación. Sin embargo, no se conoce la naturaleza de la quinasa involucrada en este mecanismo. Además, no se sabe aún si la activación por insulina de la PDE y otros efectos de la hormona, como la activación de transportadores de glucosa, están mediados por el mismo camino de señalización.

Por otra parte, y en un intento por dilucidar el mecanismo de acción de la insulina sobre la esteroidogénesis en células luteales, en nuestro laboratorio se caracterizó la fosfodiesterasa luteal que degrada nucleótidos cíclicos (PDE). Se demostró que responde a la insulina *in vitro* con un aumento de su actividad. La hormona estimula dos formas enzimáticas de PDE, que se separan por cromatografía de intercambio iónico; ambas presentan alta afinidad por AMPc y se localizan mayoritariamente en el citosol. Estas dos formas enzimáticas serían diferentes, ya que si bien ambas degradan AMPc, solamente una de ellas hidroliza GMPc. Además, los dos picos de actividad son estimulables en presencia del complejo  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina [391].

### **3. INSULINA Y OVARIO**

#### **3.1. Diabetes y función reproductiva**

La diabetes humana se acompaña de graves trastornos sexuales y reproductivos. El tratamiento con insulina sólo los corrige parcialmente. En el hombre se observa una alta frecuencia de impotencia sexual [22], así como lesiones testiculares [351], disminución del número de espermatozoides [351], bajo contenido de cetosteroides y andrógenos urinarios [170].

En la mujer diabética son comunes la atrofia ovárica, la amenorrea, la pubertad retrasada y la concomitante infertilidad [39,91,313,394]. Además, la resistencia insulínica, caracterizada por hiperinsulinemia, se asocia con manifestaciones clínicas de hiperestimulación ovárica, principalmente hiperandrogenismo [316]. Se han descrito trastornos endócrinos, caracterizados por el alto nivel de gonadotrofinas en sangre y orina y de glucocorticoides en sangre [360]. Antes de la era insulínica, era excepcional que una mujer diabética tuviera un hijo vivo. Eran frecuentes los abortos, la muerte fetal y perinatal, la toxemia, etc. Hoy en día, gracias al tratamiento insulínico y a los avances en el conocimiento del metabolismo de la mujer diabética, se ha logrado un gran mejoramiento de la evolución del embarazo [121].

Los primeros estudios sobre la diabetes en animales de experimentación datan de 1889 y consistieron en inducir la enfermedad en perros por pancreatectomía [413]. A partir de entonces, se encaró el estudio sistemático de los disturbios reproductivos en la diabetes experimental, inicialmente en animales

pancreatectomizados y luego empleando agentes diabetogénicos, como el aloxano o la estreptozotocina.

En ratas hembra diabéticas por aloxano se ha descrito menor fertilidad, tendencia a abortar, lesiones morfológicas en hipófisis anterior, ovario y útero, menor proporción de animales que ovulan y menor número de óvulos en cada ovulación. Estas alteraciones pueden ser corregidas parcialmente con terapia insulínica [17,78,225,228,230,233,366,374]. Los trastornos uterinos, que dificultan la nidación del huevo y el posterior desarrollo fetal, podrían deberse a la disminución de estrógenos en los animales diabéticos, o bien, a trastornos metabólicos propios del útero [115].

### ***3.1.1. La diabetes por estreptozotocina como modelo experimental***

La estreptozotocina ( STR; 2 - deoxi - 2 - ( 3 - metil - 3 - nitrosourea ) - D -glucopiranos) es un antibiótico que se extrae del hongo *Streptomyces achromogenes* y que posee la capacidad de producir, en corto tiempo, un estado de franca diabetes. Tal efecto se logra plenamente dentro de las 48 hs y se caracteriza por una hipoglucemia e hipoglicosuria iniciales (alrededor de las 10 hs de inyectada la droga). Este estado se debe a la liberación brusca de insulina, al destruirse las células beta del páncreas. Luego de este período, se produce una hiperglucemia progresiva y comienza a aparecer glucosa en orina, hasta estabilizarse a partir del octavo día [187].

El sitio de acción de la STR sobre el páncreas se limita a las células beta de los islotes de Langerhans, a las que se une gracias a su componente de glucosa, que favorece su incorporación al interior celular. Allí ejerce una intensa actividad



niveles de  $\text{NAD}^+$  intracelulares, inhibiendo su síntesis o incrementando su degradación, y por lo tanto destruyendo las células [270]. Por otra parte, la STR prácticamente no presenta efectos tóxicos no específicos, a diferencia del aloxano, que produce 10 veces más mortalidad y es altamente nefrotóxico [168].

### **3.2. Efecto de la insulina sobre el ovario**

Los innumerables trastornos sexuales y reproductivos que se observan en el estado diabético son una prueba de la importancia de la insulina en el normal funcionamiento del ovario [114,206,233]. En nuestro laboratorio se ha reportado, en ratas diabéticas por estreptozotocina, una disminución en el número de receptores ováricos de LH y en la producción de progesterona de células luteales en respuesta a la gonadotropina; ambos parámetros pudieron restaurarse con terapia insulínica [389]. Además, en ratas ovariectomizadas diabéticas por estreptozotocina, se observó una reducción en la bioactividad de la LH, tanto basal como estimulada por GnRH, que pudo ser revertida por tratamiento con estradiol, sugiriendo la importancia del ambiente esteroideo en la modulación de dicha bioactividad [388].

Por otro lado, la interpretación de los resultados obtenidos utilizando animales diabéticos se complica debido a las alteraciones metabólicas asociadas, como pérdida de peso, hiperglucemia, etc.

Con estos antecedentes, y en un intento por caracterizar los efectos directos de la insulina sobre el ovario, en los últimos años se ha estudiado la acción de esta hormona sobre células ováricas aisladas. Tales estudios han revelado la presencia de receptores específicos de insulina en estroma y células foliculares del

ovario humano [182,317], en células de granulosa porcinas [322] y en cuerpo lúteo y células tecales-intersticiales de rata [158,216].

En cuanto a la respuesta a la insulina en el ovario, se ha demostrado un efecto estimulador de la hormona sobre la biosíntesis de esteroides en células de granulosa porcinas, bovinas y humanas [124,347,409], en células luteales de rata [216], en células tecales-intersticiales porcinas, humanas y de rata [32,54] y en estroma y teca de pacientes con resistencia insulínica, hiperandrogenismo y acantosis nigricans [33].

Por otro lado, muy poco es lo que se conoce acerca de qué puntos metabólicos claves regula la insulina en células ováricas. En células de granulosa porcinas, Veldhuis *et al.* demostraron un efecto estimulador de la insulina sobre la producción de progesterona, pregnenolona y 20-OH-P, así como la amplificación que ejerce la hormona sobre las acciones estimuladora del estradiol y el 8-bromo-AMPc. Además, reportaron que la insulina aumenta el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub>, lo que se traduce en un aumento de la actividad de la SCC [409].

En nuestro laboratorio, en estudios *in vitro*, se describió un efecto estimulador de la insulina, en dosis fisiológicas, sobre la producción de progesterona en suspensión de células luteales de rata [216]. Por otra parte, en cultivo de células luteales se observó un aumento de los niveles de progesterona, 20-OH-P y de la actividad de aromatasa en presencia de insulina [345]. También se describió un incremento de la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc (PDE) en células luteales incubadas en presencia de insulina [391].

Otra de las patologías que sugirió que la insulina tendría un efecto directo sobre el ovario es el caso de pacientes con síndromes de resistencia insulínica y

acantosis nigricans. Estos pacientes exhiben síntomas de hiperestimulación ovárica con hiperandrogenismo. Es un grupo heterogéneo que posee en común niveles elevados de insulina. La causa de la resistencia insulínica puede ser una deficiencia genética de receptores de insulina, una enfermedad autoinmune (en cuyo caso la resistencia a insulina se debe a anticuerpos antirreceptor de insulina) o la presencia de receptores con una actividad de tirosina quinasa defectiva. En dichos pacientes se ha reportado la presencia de ovario poliquístico o hipertecosis con varios grados de hiperandrogenismo [314].

### **3.3. Producción y acción de los factores de crecimiento semejantes a la insulina en el ovario**

Diversos trabajos científicos dan cuenta de la presencia de receptores de IGF-I en el ovario, tanto en el humano como en rata y cerdo [8,27,31,125,303,385,407]. Su síntesis estaría bajo la influencia de la FSH y, en menor proporción, de la LH. Las funciones que cumple el IGF-I en el ovario abarcan desde una acción mitogénica, estimulando la proliferación celular, hasta efectos sobre la esteroidogénesis (regulando la síntesis de progesterona y estradiol) y sobre la producción de oxitocina, proteoglicanos e inhibina [6,11,31,300,350,407,434]. Una de las hipótesis planteadas es que el IGF-I actuaría como amplificador de la acción que ejercen las gonadotrofinas sobre la adenilato ciclasa y también en pasos posteriores a la formación de AMPc [5].

En el ovario de rata, FSH e IGF-I producen un aumento de la proliferación de las células de la granulosa [44] y el IGF-I aumenta la biosíntesis de andrógenos mediada por LH en células de la teca [54]. En granulosa porcina, el aumento en la síntesis de progesterona por IGF-I y FSH se ve potenciado por el estradiol [411]. Por

otra parte, recientemente se ha reportado que el IGF-I es capaz de estimular la expresión del citocromo P450<sub>SCC</sub>, tanto en células de granulosa porcinas, como en células tecales-intersticiales de rata [239,410].

Se ha demostrado que las células de la granulosa sintetizan IGF-I [145], reforzando la idea de un accionar autócrino o parácrino de este factor. Su síntesis es dependiente de la acción de FSH y estradiol [172] y sería también dependiente de GH [80]. En la rata, el ovario es el tercer tejido con mayor expresión de ARNm de IGF-I [279] y su síntesis está confinada a las células de la granulosa de folículos en desarrollo [299]. Si bien inicialmente se reportó que el cuerpo lúteo no expresaba IGF-I, en trabajos más recientes se pudo demostrar la presencia de ARNm tanto del factor como de su receptor en células luteales grandes de ovario de rata [303].

La presencia de receptores de IGF-II en ovario fue demostrada tanto en especies animales como en el humano [81,157]. El IGF-II estimula la producción de progesterona en células de granulosa porcinas [407]. La expresión de IGF-II en el ovario de rata estaría circunscrita a las células de la teca y sería inhibida por los estrógenos, mientras que en el ovario humano se encontró expresión del factor en células granulosa-luteínicas y en el ovario menopáusico [157].

Además de la síntesis de los IGFs, se ha demostrado la presencia de IGFBPs en el ovario de especies animales y de humano [132]. El papel que se les adjudica es el de regular la biodisponibilidad del IGF-I, pero además se ha reportado una acción directa de estas proteínas transportadoras sobre la esteroidogénesis folicular y la proliferación [40,401].

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue avanzar en la dilucidación del mecanismo de acción de la insulina en células luteales. Para ello se generaron tres diseños experimentales distintos, que componen los tres capítulos del presente trabajo de tesis; en todos ellos existen alteraciones de los niveles de insulina. Por un lado, se indujo un estado diabético en ratas por administración de estreptozotocina; por otro lado, se ensayó el efecto de la insulina *in vitro* sobre células luteales en incubaciones cortas o en cultivo. Por último, se provocó hiperinsulinemia en ratas por tratamiento *in vivo* con la hormona. En los tres sistemas se evaluaron distintos parámetros de la función luteal.

Los objetivos específicos que se plantearon fueron los siguientes:

1. Estudiar el efecto de la diabetes inducida por estreptozotocina sobre la actividad de la fosfodiesterasa de AMPc en células luteales.
2. Estudiar el efecto de un sistema generador de NADPH sobre la esteroidogénesis en células luteales y su posible modulación por insulina.
3. Evaluar, en cultivo de células luteales, la acción de la insulina sobre el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub>.
4. Comparar el efecto de distintas concentraciones de insulina e IGF-I sobre la esteroidogénesis en células luteales a tiempos cortos y largos y dilucidar cuál sería el receptor involucrado en cada caso.

**5. Estudiar el efecto *in vivo* de la insulina sobre la biosíntesis de esteroides y sobre el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub>.**

**6. Estudiar el efecto *in vivo* de la insulina sobre la metabolización de la progesterona y sobre la unión de la LH a su receptor en células luteales de rata.**

## ***MATERIALES Y METODOS***

## 1. MATERIALES

Las gonadotrofinas PMSG (Eleagol) y hCG (Endocorion) usadas para superovulación fueron obtenidas de Laboratorios Elea (Buenos Aires, Argentina). La insulina Zn-protamina bovina (80 UI/ml) fue de Laboratorios Beta (Buenos Aires, Argentina). La estreptozotocina fue de Upjohn Company (Kalamazoo, MI, USA).

[1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)]-progesterona (98,3 Ci/mmol), [1,2-<sup>3</sup>H(N)] 20 $\alpha$ -hydroxypregn-4-ene-3-ona (45,6 Ci/mmol), [2,4,6,7-<sup>3</sup>H(N)]- estradiol (100,5 Ci/mmol), [7-<sup>3</sup>H(N)]-pregnenolona (19,1 Ci/mmol), [2,8-<sup>3</sup>H] adenosina-3',5'-fosfato cíclico (<sup>3</sup>H-AMPC; 34,6 Ci/mmol) y Omnifluor fueron adquiridos en New England Nuclear (Boston, MA, USA). Dulbecco's Modified Eagle Medium con 4,5 g glucosa/litro (DMEM), Ham's F-12 nutrient mixture (F-12), suero fetal bovino (SFB) y los marcadores de peso molecular preteñidos (rango: 14.300-200.000) fueron obtenidos en Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA).

Progesterona, 20 $\alpha$ -hydroxypregn-4-ene-3-ona, estradiol, pregnenolona, androstenodiona, HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etansulfónico], desoxirribonucleasa I (DNasa I), albúmina sérica bovina fracción V (BSA), metil-isobutil-xantina (MIX), carbón activado, acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS), Tris, glicina, persulfato de amonio, N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED), IgG de cabra anti-conejo conjugada a peroxidasa, 3,3'-diaminobencidina, PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro), TPCK (N-tosil-L-fenilalanina-clorometil cetona), ZPCK (N-CBZ-L-fenilalanina clorometil cetona), TLCK (1-cloro-3-tosilamido-7-amino-L-2-heptanona), 5'nucleotidasa de veneno de serpiente (King Cobra),



anhídrido acético, trietilamina, AMPc y TME-SA (tirosil-metil éster de succinil AMPc) fueron obtenidos en Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

La colagenasa tipo CLS II (125 UI/mg) fue de Worthington Biochemical Co. (Freehold, NJ, USA), la DEAE-celulosa (DE-52), de Whatman (Kent, Inglaterra) y la resina Dowex AG<sub>1</sub>-X<sub>4</sub>, de Bio Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). La LH humana (hLH: 7,2 UI/μg) fue generosamente donada por The National Pituitary Agency, NIH (Bethesda, MD, USA). Aminoglutetimida (AG), cianocetona (CK) y 25-hidroxi-colesterol (CHO) fueron adquiridos en Steraloids (Wilton, NH, USA). Sephadex G50 y Percoll fueron de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia).

El anticuerpo hecho en conejo contra citocromo P450<sub>SCC</sub> de adrenal bovina fue gentilmente donado por la Dra. Anita H. Payne (University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA). El anticuerpo anti-AMPc fue de Chemicon International (El Segundo, CA, USA).

El etanol absoluto y el éter etílico (para análisis) fueron obtenidos de Merck (Buenos Aires, Argentina). El tolueno fue de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina). Los demás compuestos químicos utilizados fueron de grado analítico.

## **2. ANIMALES**

### **2.1. Condiciones generales**

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, provenientes del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Los animales fueron mantenidos con períodos de 12 horas de luz (de 7 a 19 hs) y 12 hs de oscuridad, a temperatura controlada entre 21 y 24°C y con alimento y agua *ad libitum*.

## **2.2. Tratamientos**

### ***2.2.1. Obtención de ratas superovuladas***

Se indujo el estado de pseudopreñez en ratas prepúberes (23 a 25 días) o adultas (60 días) mediante la inyección de PMSG (25 UI/rata), seguida a las 48 hs de una inyección de hCG (25 UI/rata), ambas administradas en forma subcutánea. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 5 o 6 días después de la última inyección. En algunos experimentos, los animales fueron sacrificados por decapitación sin anestesia y se recogió sangre troncal para determinaciones hormonales. La evaluación del estado de pseudopreñez se realizó por inspección visual de los ovarios en el momento del sacrificio y por microscopía óptica (ver más adelante).

### ***2.2.2. Inducción de la diabetes por estreptozotocina (STR)***

Se utilizaron ratas hembra de 60 días de edad (aproximadamente 200 g de peso). Las ratas fueron separadas en tres grupos experimentales:

Grupo C (control): se les administró por vía endovenosa el vehículo correspondiente.

Grupo D (diabéticas): se les administró STR por la vena caudal en una dosis de 65 mg/kg peso iv. La droga se preparó en solución salina acidificada con unas gotas de ácido cítrico 0,025 M hasta ajustar el pH a 4,5, en una concentración de 32 mg/ml. Dicha droga destruye selectivamente las células beta del páncreas [323].

Grupo Ins (diabéticas inyectadas con insulina): se indujo el estado diabético de forma idéntica al Grupo D. A los 15 días de la inyección de STR, se inició el tratamiento con insulina-Zn-protamina bovina. Se administraron 2 UI/rata sc diariamente durante 15 días.

Todos los animales fueron superovulados tal como se describió más arriba. Las experiencias se realizaron 30 días después de la inyección de STR (luego de 5 días de la administración de hCG).

### *2.2.3. Evaluación del estado diabético*

Tres días después de la inyección de STR se midió la glucosa en sangre, usando tiras reactivas Dextrostix, y en orina, por medio de tiras reactivas Multistix (Laboratorios Miles de Argentina). Los criterios utilizados para determinar el estado diabético fueron los siguientes:

- Hiperglucemia: en los animales diabéticos, los valores de glucosa en sangre oscilaron entre 300 y 390 mg/100 ml, mientras que los controles tuvieron un promedio de 90 mg/100 ml.
- Glucosuria: en los diabéticos, los valores de glucosa en orina fueron mayores que 10 g/100 ml.
- Poliuria: El volumen urinario de los animales diabéticos fue notablemente mayor que el de los controles.

También se observó polidipsia, disminución del crecimiento, hipertrofia visceral y atrofia cutánea.

En el grupo Ins se detectó una relativa normalización de la glucemia. También se observó un aumento del peso corporal, disminución de la polidipsia y poliuria, regresión de la hipertrofia visceral y de la atrofia cutánea.

#### ***2.2.4. Tratamiento in vivo con insulina***

Ratas prepúberes (23 a 25 días) fueron separadas en dos grupos: C (controles) e I (tratadas con insulina). Todos los animales fueron superovulados tal como se describió anteriormente. Los animales del grupo I recibieron además 0,5 UI de insulina-Zn-protamina bovina (sc) junto con la PMSG (día 1) y desde el día 2 al 9 se les inyectó 1 UI de insulina diaria; las ratas controles recibieron vehículo. El agua de bebida de las ratas del grupo I se reemplazó por una solución de glucosa al 2,5%. Todos los animales fueron sacrificados una hora después de la última administración de insulina.

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1. Aislamiento de células luteales de ovarios altamente luteinizados**

Para el aislamiento de células luteales se utilizó el procedimiento descrito por Conti *et al.* [68]. Se extrajeron los ovarios y se suspendieron en DMEM:F-12 (1:1) con el agregado de HEPES 10mM, pH 7,4 (DMEM-HEPES), se lavaron, se desgrasaron y cortaron finamente. El tejido ovárico se resuspendió en DMEM-HEPES (1 ml/ovario), conteniendo BSA al 0,5%, 1 mg de colagenasa/ml y DNasa I 0,008%. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 40 minutos con agitación constante; seguidamente se filtró la suspensión celular a través de una malla de Nylon (Nitex 50), se lavó con DMEM-HEPES, BSA 0,1% y se exprimió para aumentar el

rendimiento. El filtrado se centrifugó se lavó dos veces con el mismo medio. Se resuspendió el pellet, se realizó un conteo celular y se determinó la viabilidad (que resultó siempre mayor del 90%) por el método de exclusión de azul Trypan. Se hicieron luego las diluciones adecuadas en DMEM-HEPES, BSA 0,5% para incubaciones cortas o en DMEM:F12 (1:1) conteniendo  $\text{NaHCO}_3$  2,2 g/l (medio BIC) para cultivo.

### **3.2. Medición de la actividad de fosfodiesterasa (PDE)**

#### ***3.2.1. Incubación de células luteales con insulina y preparación de las fracciones celulares para la medición de PDE***

Las células luteales de ratas adultas superovuladas de los grupos C, D e Ins ( $3 \times 10^6$  células/ml) se incubaron durante 10 min en DMEM-HEPES con BSA 0,1% en presencia o ausencia de insulina (2 nM). Las incubaciones se realizaron a 37°C con agitación suave, y se detuvieron enfriando a 0°C. Luego se centrifugó a 800 x g durante 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces por centrifugación con 5 ml de buffer Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, PMSF 0,1 mM (buffer A) con el agregado de sacarosa 0,25 M. Luego de resuspender en buffer A, se procedió a la homogeneización y posterior sonicación (2 pulsos de 30 seg) en frío en un volumen de 0,15 ml de buffer A. El homogenato se centrifugó a 10000 x g durante 5 min, se separó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en el mismo buffer y se volvió a centrifugar. Ambos sobrenadantes se juntaron y se determinó la actividad de PDE en pellets y sobrenadantes de estos extractos crudos, utilizando entre 0,015 y 0,095 mg de proteína por incubación.

### ***3.2.2. Purificación de la PDE***

El sobrenadante de 10.000 x g de células luteales de los distintos grupos experimentales se purificó parcialmente a través de una columna de intercambio iónico de DEAE-celulosa (1,2 x 5 cm) equilibrada con buffer A. Se sembraron entre 0,1 y 0,25 ml de sobrenadante (de 0,3 a 1,5 mg de proteína), se lavó con 1,5 ml de buffer A y se eluyó con un gradiente discontinuo de NaCl (0,1 a 0,5 M) en el mismo buffer. Se recolectaron fracciones de 0,5 ml (6 fracciones por concentración de NaCl). La actividad de PDE se determinó en alícuotas de 30 µl de cada fracción con el agregado de CaCl<sub>2</sub> 25 µM y BSA 1 mg/ml o CaCl<sub>2</sub> 25 µM y 20 µg/ml de calmodulina de cerebro bovino.

### ***3.2.3. Determinación de la actividad de PDE***

La actividad enzimática se determinó mediante el método descrito por Thompson y Appleman [392] con las modificaciones introducidas por Londesborough [234].

La actividad de fosfodiesterasa se midió en mezclas de reacción que contenían: buffer Tris-HCl 40 mM, pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, <sup>3</sup>H-AMPc 1 µM (600 cpm/pmol) y preparación enzimática en un volumen final de 0,1 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C durante 5 a 30 minutos.

La reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 90 segundos. Luego se incubó nuevamente con el agregado de 0,04 ml de 5'nucleotidasa de veneno de serpiente (King Cobra) 2 mg/ml en buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Esta segunda

incubación se detuvo por agregado de 0,05 ml de una solución conteniendo EDTA 50 mM y adenosina 5 mM.

A continuación se agregó 1 ml de una suspensión de resina AG<sub>1</sub>-X<sub>4</sub> (200-400 mesh) al 30% (v/v) en agua y etanol 30%. Después de sedimentar, se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y se contó la radiactividad en una mezcla conteniendo 0,4% (p/v) de Omnifluor y 30% (v/v) de Tritón en tolueno.

### **3.3. Determinación de AMPc intracelular**

Se agregó ácido tricloroacético (20%) frío (2 µl/mg de ovario) a ovarios enteros provenientes de ratas de los grupos C, D e Ins. Luego de homogeneizar (Ultraturrax) se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min, se descartó el pellet obtenido y se hicieron seis extracciones del sobrenadante con 2 volúmenes de éter etílico cada vez. La fase acuosa se congeló hasta la determinación del nucleótido cíclico por radioinmunoensayo (RIA).

#### **3.3.1. Marcación de AMPc**

Para utilizar como trazador en el radioinmunoensayo de AMPc se sintetizó un derivado iodinado de la siguiente forma: se partió del tirosil metil éster de succinil AMPc (TME-SA). Se mezcló 1 nmol (0,6 µg) de TME-SA contenido en 10 µl de agua con 2 mCi de <sup>125</sup>I Na contenido en 5 µl de NaOH 0,1 N y con 25 µl de fosfato de potasio 0,5 M, pH 6,5. Se agregaron luego 10 µl de cloramina T (3 mg/ml) y se agitó inmediatamente. El producto de reacción se purificó por TLC en placas de celulosa, usando una mezcla de 1-butanol/ácido acético glacial/agua (12:3:5) como solvente de

desarrollo. El derivado radiactivo, de un Rf de 0,6, se eluyó de la celulosa con agua, se dividió en alícuotas y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La estabilidad química del trazador fue buena hasta por lo menos 5 meses y la eficiencia de la marcación fue de un 50%.

### ***3.3.2. Medición de los niveles de AMPc***

El dosaje de AMPc se realizó por RIA según el método de Steiner *et al.* [375]. Este método se basa en el desplazamiento competitivo de un derivado de AMPc marcado con  $^{125}\text{I}$  capaz de unirse a un anticuerpo preparado contra succinil-AMPc conjugado con albúmina. Alícuotas de 0,1 ml de los medios de incubación o de los extractos acuosos se acetilaron agregando 5  $\mu\text{l}$  de una mezcla de anhídrido acético y trietilamina 1:2 (v/v) y agitando vigorosamente. Esta reacción aumenta la sensibilidad del radioinmunoensayo, ya que el AMPc acetilado tiene mayor afinidad por el anticuerpo. Luego de 5 min se agregan el ( $^{125}\text{I}$ )TME-SA (15.000 cpm) y el anticuerpo preparados en el buffer de ensayo: buffer acetato 0,05 M, pH 6,2. El anticuerpo se utilizó en una dilución apropiada (1:4000) para ligar el 40% del trazador. El rango de utilidad fue de 25 a 5000 fmoles en un volumen final de 0,3 ml. Luego de 16 hs de incubación a  $4^{\circ}\text{C}$ , se agregaron 0,05 ml de BSA 2% en buffer acetato y 2 ml de etanol (96%) y los tubos fueron centrifugados durante 15 min a  $2000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se aspiraron los sobrenadantes y se contó la radiactividad asociada a los pellets en un contador Beckman Gamma 4000, con un 73% de eficiencia.



### **3.4. Determinación de receptores de LH/hCG**

#### ***3.4.1. Preparación de hCG iodada***

En el laboratorio del Dr. E.H. Charreau, se marcó hCG altamente purificada por el método de cloramina T limitante [262]. En breve, se agregaron en forma consecutiva alícuotas de 5  $\mu$ l de una solución diluída (0,006%) de cloramina T a 20  $\mu$ l de buffer fosfato 0,05 M (pH 7,4) conteniendo 1 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  y 20  $\mu$ g de hCG. La iodación se detuvo cuando la actividad específica, estimada por precipitación con TCA, fue de aproximadamente 150  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ . La mezcla de reacción se transfirió a una columna de Sephadex G50 (0,9 x 10 cm) previamente equilibrada con  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,05 M, NaCl 0,1 M, azida sódica 0,02%, BSA 0,2%, pH 7,4. Una vez separado el pico hormonal del de iodo libre, las fracciones correspondientes a la hormona fueron alícuotadas y congeladas a  $-70^\circ\text{C}$ .

#### ***3.4.2. Determinación de la máxima capacidad de unión (MCU) de la $^{125}\text{I}$ -hCG***

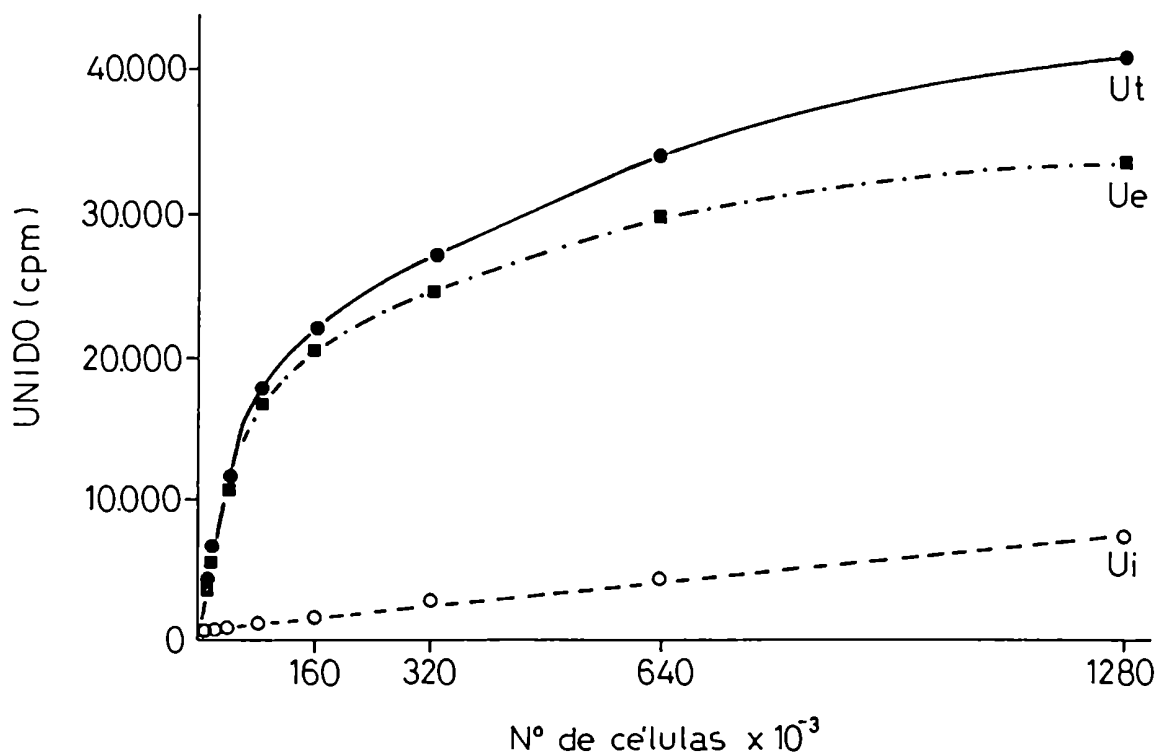
La máxima capacidad de unión de la hormona se determinó usando una preparación de membranas de testículo de rata como fuente de receptores de LH/hCG. Para esto, se decapsularon los testículos de una rata adulta y se homogeneizaron en PBS (1:4 p/v), se filtró por una malla de Nitex y se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$ . El pellet obtenido se resuspendió 1:4 (p/v) en PBS y se guardó en alícuotas a  $-70^\circ\text{C}$ .

Se incubaron distintas alícuotas (conteniendo entre 500 y 1000  $\mu$ g de proteína) del preparado de membranas de testículo de rata en PBS con 15.000 cpm de  $^{125}\text{I}$ -hCG durante 16 hs a  $20^\circ\text{C}$ . Una serie paralela de tubos se incubó en presencia de

un exceso (5  $\mu\text{g}$ ) de hCG no radiactiva para el cálculo de la unión inespecífica. La reacción se detuvo agregando 2 ml de PBS con BSA 0,2% frío y los tubos se centrifugaron a 2000 x g durante 20 min a 4°C. La radiactividad en el pellet final se determinó usando un espectrómetro Beckman Auto Gamma-4000 con un 73% de eficiencia. La unión específica de  $^{125}\text{I}$ -hCG se calculó sustrayendo la unión inespecífica, observada en presencia de un exceso de hCG no radiactiva, de la unión total, observada en presencia de  $^{125}\text{I}$ -hCG sola. Se construyó luego un gráfico de (radiactividad específica unida)<sup>-1</sup> versus (cantidad de proteína agregada)<sup>-1</sup>, de cuya ordenada al origen se calculó la fracción de  $^{125}\text{I}$ -hCG que se uniría a una concentración infinita de sitios receptores (MCU).

#### **3.4.3. Ensayos de unión de hCG al receptor luteal**

Se incubaron células luteales provenientes de ratas controles (entre 10.000 y 1.280.000 células/tubo) en DMEM-HEPES BSA 0,5% con 130.000 cpm de  $^{125}\text{I}$ -hCG a 37°C durante 3 hs en un volumen de 0,25 ml. Se hicieron incubaciones en paralelo en presencia de 5  $\mu\text{g}$  de hCG no radiactiva para determinar la unión no específica. Luego de agregar 2 ml de PBS frío, conteniendo BSA 0,2% y celite 1 mg/ml, los tubos fueron centrifugados a 2000 x g por 20 min a 4°C y se midió la radiactividad en los pellets. Los resultados obtenidos (Fig. 11) indicaron que la unión específica de  $^{125}\text{I}$ -hCG sigue una cinética lineal respecto al número de células por incubación hasta una concentración de 80.000 células/tubo. Por lo tanto, para los ensayos subsiguientes se eligió una concentración de 40.000 células luteales por tubo. Se determinaron entonces los parámetros cinéticos de la unión de  $^{125}\text{I}$ -hCG a células luteales de ratas controles y de ratas tratadas *in vivo* con insulina. Para ello, se incubaron las células en el medio que se describió más arriba con concentraciones



**Figura 11.** Curva de unión específica de  $^{125}\text{I}$ -hCG (en cuentas por minuto) en función del número de células luteales por tubo. Las células (entre 10.000 y 1.280.000 en 0,25 ml) fueron incubadas 3 hs a 4°C con 120.000 cpm de  $^{125}\text{I}$ -hCG. La unión inespecífica se determinó en incubaciones paralelas conteniendo exceso de hCG no radiactiva. La unión específica se calculó sustrayendo la unión inespecífica observada en presencia de un exceso de hormona radioinerte de la unión observada en presencia de  $^{125}\text{I}$ -hCG sola. Ut: unión total; Ue: unión específica; Ui: unión inespecífica.

crecientes de  $^{125}\text{I}$ -hCG ( $6 \times 10^{-11}$  a  $3 \times 10^{-9}$  M), se descontó la unión inespecífica y los datos obtenidos fueron procesados por análisis de Scatchard [349].

### 3.5. Incubación de células luteales con hLH

Las células luteales provenientes de ratas controles y de ratas tratadas *in vivo* con insulina fueron incubadas en DMEM-HEPES con 0,5% de BSA durante 3 hs a 37°C, con agitación, en presencia de concentraciones crecientes de hLH (0,01 a 100 ng/ml); el volumen de incubación fue de 0,5 ml, conteniendo 200.000 células. Al finalizar la incubación, las suspensiones celulares se centrifugaron a 800 x g durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se congelaron a -20°C hasta la medición de progesterona y 20 $\alpha$ -hidroxi-progesterona por radioinmunoensayo (RIA). Para la determinación de estradiol en los medios de incubación, el protocolo fue el mismo, excepto que las células fueron incubadas en presencia de androstenodiona (0,25  $\mu\text{M}$ ) como sustrato aromatizable. Para dosar los niveles de AMPc liberado por las células luteales, éstas fueron incubadas con el agregado de un inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc: metil-isobutil-xantina (MIX; 0,1 mM). Luego de cortar la incubación por centrifugación, los sobrenadantes fueron calentados a 100°C durante 15 min y se guardaron a -20°C hasta la medición del nucleótido cíclico por RIA.

### 3.6. Medición de esteroides

Las hormonas producidas por las células luteales (progesterona, 20-OH progesterona, pregnenolona y estradiol) se midieron directamente de los medios de incubación por radioinmunoensayos (RIA) específicos desarrollados en el laboratorio. Se utilizaron antisueros obtenidos por inmunización activa de conejos, a intervalos de

dos semanas, con un conjugado esteroide:BSA. El antisuero obtenido se usó en una dilución apropiada para ligar el 40% del  $^3\text{H}$ -esteroide utilizado como trazador (25 pg, aproximadamente 10.000 cpm).

Luego de una incubación de 16 hs a 4°C, se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo por medio del agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón 0,5% y dextrano 0,05% en el buffer de ensayo:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  40 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  39,5 mM, NaCl 155 mM, azida sódica 0,1% y gelatina 1%, pH 7,0 (buffer RIA) y posterior centrifugación. Los sobrenadantes completos fueron transferidos a viales de conteo, a los que se les agregó 2,75 ml de mezcla centellante (PPO 0,5% y POPOP 0,05% en tolueno). La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1801, con una eficiencia del 62%.

Para el dosaje de progesterona sérica se utilizó una modificación del método de Abraham *et al.* [3,389]. Brevemente, una vez obtenida la sangre de los animales y producida su coagulación, se separaron los sueros para la determinación hormonal. Una alícuota de suero (0,05 ml) se extrajo dos veces con 2 ml de éter etílico cada vez y los extractos secos se resuspendieron en 1 ml de buffer RIA. Una alícuota de esta solución (10  $\mu\text{l}$ ) fue utilizada para el radioinmunoensayo de progesterona.

### ***3.6.1. Determinación de progesterona***

El rango de utilidad del ensayo fue de 12,5 a 800 pg de progesterona en un volumen final de 0,5 ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 8,0 y 14,2%, respectivamente.

### ***3.6.2. Determinación de 20 $\alpha$ -hidroxi-progesterona***

El rango de utilidad del ensayo fue de 3,125 a 400 pg de 20-OH-P en un volumen final de 0,5 ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 7,5 y 13,2%, respectivamente.

### ***3.6.3. Determinación de pregnenolona***

El rango de utilidad del ensayo fue de 12,5 a 3200 pg de pregnenolona en un volumen final de 0,5 ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 7,6 y 14,3, respectivamente.

### ***3.6.4. Determinación de estradiol***

El rango de utilidad del ensayo fue de 1,562 a 800 pg de estradiol en un volumen final de 0,5 ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 7,2 y 12,5%, respectivamente.

## **3.7. Estudio del metabolismo de la progesterona**

### ***3.7.1. Incubación de células luteales con progesterona radiactiva***

Células luteales (200.000 células en 0,5 ml) provenientes de ratas controles y de ratas tratadas *in vivo* con insulina fueron incubadas en DMEM-HEPES conteniendo BSA 0,5% con 300.000 cpm de [1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)]-progesterona durante 3 hs a 37°C en presencia o ausencia de cianocetona ( $10^{-5}$  M). Al finalizar la incubación,

las suspensiones celulares se centrifugaron a  $800 \times g$  durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los sobrenadantes se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento para cromatografía en capa delgada.

### ***3.7.2. Cromatografía en capa delgada***

Los sobrenadantes de células luteales de los grupos C e I se extrajeron dos veces con 5 volúmenes de éter etílico; los extractos etéreos se secaron por calentamiento a  $40^{\circ}\text{C}$  bajo corriente de nitrógeno y se resuspendieron en  $10 \mu\text{l}$  de éter etílico. Las muestras se sembraron en una placa de sílica gel, que se desarrolló en una mezcla de ciclohexano, cloroformo y éter (2:2:1). Una vez finalizada la corrida, se recortaron las calles laterales, correspondientes a esteroides patrones, y se realizó una autorradiografía de la placa. Los patrones, no radiactivos, se revelaron con una mezcla de etanol:ácido sulfúrico (1:9) más una punta de espátula de ácido vainillín sulfúrico. Para medir los niveles de conversión de progesterona a otros esteroides, se recortaron distintas zonas de la placa y se cuantificaron en un contador de centelleo líquido.

## **3.8. Determinación del contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub> en células luteales**

### ***3.8.1. Obtención de fracciones mitocondriales de células luteales***

Las células luteales aisladas provenientes de ratas controles o tratadas *in vivo* con insulina fueron resuspendidas en solución B (KCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  1mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, sacarosa 0,25 M e inhibidores de proteasas: PMSF 0,5 mM, ZPCK 0,025 mM, TLCK 0,025 mM, TPCK 0,025 mM) y lavadas dos veces por

centrifugación. Se resuspendieron luego en solución B sin sacarosa y fueron homogeneizadas y sonicadas. Luego de agregar sacarosa 1 M hasta una concentración final de 0,25 M, se centrifugó a 800 x g 10 min a 4°C y los sobrenadantes fueron centrifugados a 10.000 x g 15 min a 4°C. Los pellets de 10.000 x g (fracciones mitocondriales) fueron resuspendidos en solución B y congelados a -70°C hasta su utilización.

### ***3.8.2. Inmunolocalización del citocromo P450<sub>SCC</sub>***

Las fracciones mitocondriales de células luteales de los grupos C e I fueron tratadas con buffer muestra de Laemmli (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercapto-etanol 5%) y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 10% con SDS, según la técnica de Laemmli [217]. Se sembró igual cantidad de proteína en cada calle. Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en buffer Tris 0,025M, pH 8,3, glicina 0,192 M, metanol 20%, a 35 V (200 mA) durante 4 horas a 4°C. Los sitios de unión remanentes sobre las membranas se bloquearon en PBS con 20 mg/ml de leche en polvo descremada, Tween 20 0,2% durante 1 hora a T ambiente. Se agregó luego el anticuerpo policlonal de conejo anti-P450<sub>SCC</sub> de adrenal bovina 1:10.000 en buffer de bloqueo durante 1h a T ambiente, con agitación constante. Luego de lavar con el mismo buffer, se incubó con el segundo anticuerpo: anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa diluido 1:1000 en PBS-BSA 1 mg/ml por 1h a T ambiente. Se lavó con PBS-BSA, luego con buffer de revelado (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2) y se reveló con 3,3'-diaminobencidina 0,4 mg/ml y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,0001% en buffer de revelado. El contenido de P450<sub>SCC</sub> inmunorreactivo en las distintas calles se cuantificó luego por densitometría. La cuantificación del P450<sub>SCC</sub> fue validada sometiendo cantidades crecientes (0,2 - 20 µg) de proteína de células luteales a dot blot y densitometría.



Dentro del rango indicado, se observó linealidad de la señal. La determinación de pesos moleculares se efectuó por comparación con proteínas patrones preteñidas de peso molecular conocido (rango: 14.300-200.000 Da).

### **3.9. Incubaciones de células luteales con un sistema generador de NADPH**

Se aislaron las células luteales de ratas prepúberes como fue descripto anteriormente y se incubaron a 37°C durante 3 hs con agitación suave en DMEM-HEPES, BSA 0,5% con o sin el agregado de un sistema generador de NADPH (SG). Este consistió en: NADP<sup>+</sup> 1 mM, D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1 UI, D-glucosa-6-fosfato 5 mM; se incluyeron también hLH (10 ng/ml) o insulina (10 ng/ml). Otros estímulos ensayados fueron 25-hidroxi-colesterol (CHO; 10 µg/ml), aminoglutetimida (AG; 1 mM) y cianocetona (CK; 0,5 mM). En algunos ensayos se utilizó NADPH en distintas concentraciones. El volumen de incubación fue de 0,5 ml conteniendo 250.000 células luteales. Finalizada la incubación, se centrifugó a 800 x g durante 15 min y se congelaron los sobrenadantes hasta las determinaciones de P y 20-OH-P por RIA. Para dosar los niveles de AMPc liberado por las células luteales, luego de cortar la incubación por centrifugación, los sobrenadantes fueron calentados a 100°C durante 15 min y se guardaron a -20°C hasta la medición del nucleótido cíclico por RIA.

### **3.10. Purificación y cultivo de células luteales**

Para purificar la población de células luteales, la suspensión celular se sembró en un gradiente de densidad discontinuo de Percoll a temperatura ambiente. Este gradiente, compuesto de cuatro capas de 3 ml cada una de densidades 1,020; 1,042; 1,060 y 1,085 g/ml, se armó en un tubo de cultivo de poliestireno que se

centrifugó a 600 x g durante 20 minutos. Las células presentes entre las capas de densidades 1,020 y 1,042 g/ml se aspiraron, resuspendieron en DMEM-HEPES y contaron en un hemocitómetro. Se obtuvo una preparación libre de restos celulares y glóbulos rojos. La viabilidad fue superior al 90%.

Para el cultivo celular se cubrieron placas de plástico de 24 pozos con suero fetal bovino (SFB). Se sembraron aproximadamente 500.000 células por pozo en DMEM:F12 conteniendo  $\text{NaHCO}_3$  2,2 g/l (medio BIC) y BSA 0,2% y se incubaron en una cámara de cultivo (5%  $\text{CO}_2$  en aire a 37°C). Luego de 16 horas se cambiaron los medios para eliminar las células no adheridas a la placa. Las células se cultivaron con SG, insulina (10 ng/ml), LH (10 ng/ml) o NADPH (1 mM) durante 3 hs o con insulina o IGF-I en concentraciones variables durante 24 hs, al cabo de las cuales los medios fueron recogidos y congelados a -20°C para la determinación de P y 20-OH-P por radioinmunoensayo (RIA).

Para determinar el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub> en células luteales en cultivo, se procedió en forma similar, pero con algunas diferencias. Las células se cultivaron en placas de 60 mm de diámetro durante 24 hs en presencia o ausencia de insulina 10 ng/ml. Se levantaron los medios de cultivo y se agregó a cada placa 0,5 ml de una solución de tripsina 0,05% y EDTA 0,02% en PBS y se dejó en estufa a 37°C durante 5 min (se observó que en ese tiempo las células se despegaron de las placas). El tratamiento se detuvo por agregado de BIC con SFB 10%. Las células se transfirieron a un tubo de plástico y se centrifugaron a 400 x g durante 10 min. Luego de resuspender el pellet celular en solución B (ver más arriba), se procedió tal como se describió anteriormente para determinar el contenido del P450<sub>SCC</sub>.

### **3.11. Regulación de la síntesis de novo del citocromo P450<sub>SCC</sub>**

#### ***3.11.1. Incorporación de <sup>35</sup>S-metionina en células luteales en cultivo***

El cultivo celular se hizo básicamente como se describió más arriba, aunque con algunas modificaciones. Las placas se cubrieron con colágeno de cola de rata. Se sembraron 500.000 células por pozo en 0,35 ml de BIC con suero fetal bovino 10% y se incubaron en una cámara de cultivo (5% CO<sub>2</sub> en aire a 37°C). Luego de 16 horas se cambiaron los medios y se continuó el cultivo en el mismo medio o en medio libre de suero en presencia o ausencia de insulina (10 ng/ml). A las 24 hs del agregado del estímulo, se cambiaron los medios por BIC libre de metionina y luego de 2 hs se agregó <sup>35</sup>S-metionina (50 µCi/pozo). A las 5 hs se levantaron los medios y se hicieron tres lavados de las células con 0,25 ml de PBS. Se lisaron las células por agregado de 0,3 ml de buffer RIPA (Tris 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, desoxicolato 0,5%, SDS 0,1%) con inhibidores de proteasas y se dejó durante 30 min en hielo. Luego de congelar y descongelar varias veces, se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min, se descartaron los pellets y los sobrenadantes fueron congelados a -20°C.

#### ***3.11.2. Inmunoprecipitación del citocromo P450<sub>SCC</sub>***

Se cuantificó la radiactividad incorporada a proteínas en los lisados tomando alícuotas de 5 µl, agregando 1 ml de PBS con BSA 0,2% frío y 1 ml de TCA 20% frío y se incubó por 15 min. Se filtró luego por fibra de vidrio y, luego de lavar y secar los filtros, se determinó la radiactividad asociada a ellos en un contador de centelleo líquido. Se llevaron entonces los lisados a una misma concentración de cpm/ml diluyendo con buffer RIPA. Se agregó a cada tubo suero normal de conejo

(3,3%) y se incubó 1 hora a 4°C. Se agregó luego una suspensión de membranas de *Staphylococcus aureus* (Pansorbin) y se dejó 90 min en hielo. Se centrifugó a 10.000 x g 5 min a 4°C y los sobrenadantes fueron incubados a 4°C durante 16 hs con un anticuerpo policlonal hecho en conejo contra citocromo P450<sub>SCC</sub> de adrenal bovina 1/250. Luego de incubar 30 min en hielo con Pansorbin (10%), se centrifugó 1 min a 10.000 x g a 4°C. Los pellets fueron lavados dos veces con buffer RIPA, resuspendidos en buffer muestra de Laemmli y calentados en baño de agua durante 5 min. Se sembraron luego los inmunoprecipitados en un gel de poliacrilamida 10% con SDS y se realizó una corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes. Los geles resultantes fueron secados y autorradiografiados utilizando películas Kodak X-Omat AR.

### **3.12. Determinación de proteínas**

Las proteínas se dosaron por el método de Lowry *et al.* [236], utilizando BSA como estándar. Las muestras de membrana fueron previamente digeridas con NaOH 0,5 N durante 16 hs a T ambiente.

### **3.13. Medición del contenido de ADN celular**

Alícuotas de las suspensiones de células luteales fueron centrifugadas a 250 x g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y, luego de agregar 0,2 ml de EDTA 2 mM, las células fueron congeladas hasta la medición de ADN. Para esta determinación, las células fueron descongeladas y sonicadas con 3 pulsos de 15 segundos. Se agregó 1,8 ml de solución de Hoescht (0,1 µg/ml) en buffer Tris 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM. Las muestras fueron medidas en un

flurómetro. Se compararon las mediciones con una curva estándar de ADN de esperma de salmón (entre 25 y 250 ng/ml).

### **3.14. Estadística**

Todos los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  SEM. Las comparaciones estadísticas se hicieron por el test de *t* de Student o por análisis de la varianza (ANOVA). Los experimentos se realizaron como mínimo dos veces con 8-15 animales por grupo experimental.

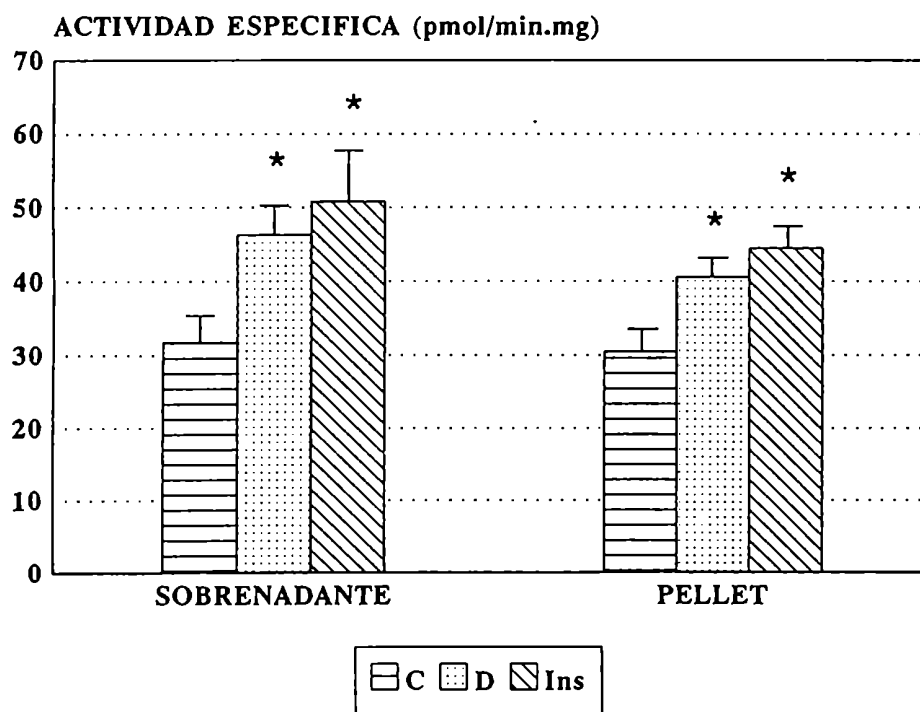
## ***RESULTADOS***

## **Capítulo 1: Efecto de la diabetes por estreptozotocina sobre la actividad de fosfodiesterasa en células luteales**

Con el objeto de dilucidar el mecanismo de acción de la insulina sobre la esteroidogénesis en células luteales, en nuestro laboratorio se caracterizó la fosfodiesterasa luteal que degrada nucleótidos cíclicos (PDE). Se demostró que es estimulable por concentraciones fisiológicas de insulina *in vitro* y que responde al complejo  $Ca^{++}$ -calmodulina [391].

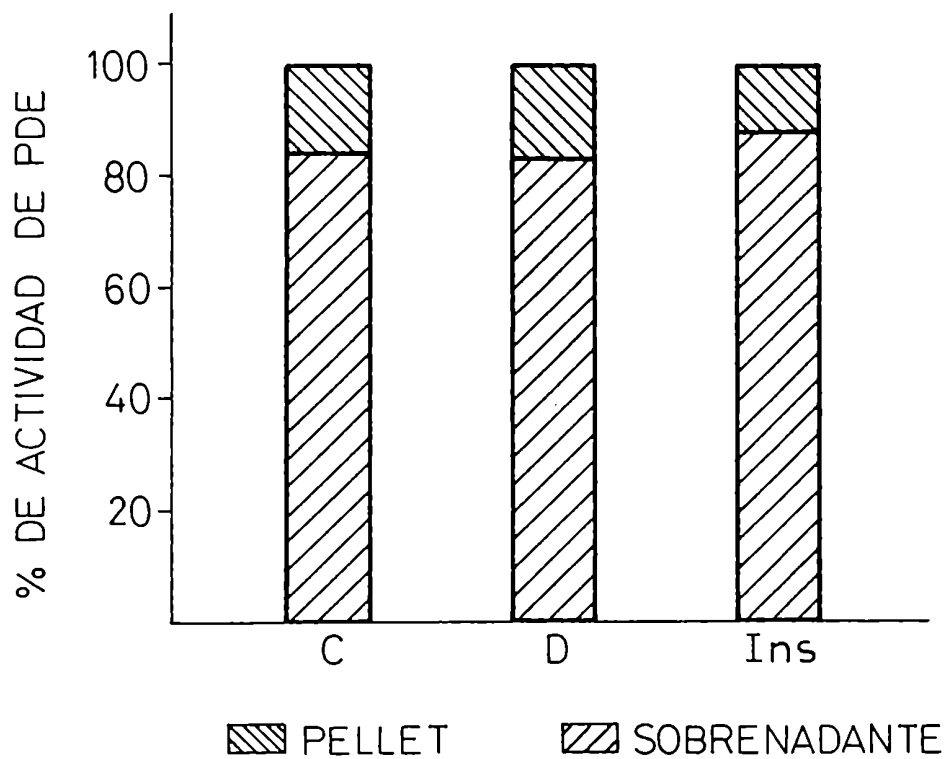
En el presente trabajo se quiso conocer el estado de esta enzima en períodos crónicos de privación de insulina, como es el caso de la diabetes experimental inducida por estreptozotocina. Se utilizaron ratas adultas, que fueron divididas en tres grupos experimentales: controles (C), diabéticas (D) y diabéticas tratadas con insulina (Ins). Todos los animales fueron superovulados por tratamiento con gonadotrofinas.

Las células luteales provenientes de ratas de los grupos C, D e Ins fueron homogeneizadas y centrifugadas 5 min a 10.000 x g. Se separaron pellets y sobrenadantes, en los que se determinó la actividad de PDE, utilizando  $^3H$ -AMPc como sustrato. Tal como se puede observar en la Figura 12, tanto en pellets como en sobrenadantes se encontró un aumento significativo de la actividad específica de la enzima en células luteales provenientes de ratas diabéticas, que no pudo ser revertido por la terapia sustitutiva con insulina (grupo Ins). En la Figura 13 se muestra la distribución subcelular de dicha actividad enzimática. Se observa que, en los tres grupos experimentales, la mayor parte de la actividad de PDE (entre el 83 y el 88%) se encuentra en el sobrenadante de 10.000 x g. Esta fracción se utilizó para todos los ensayos subsiguientes.



**Figura 12.** Actividad específica de fosfodiesterasa en los sobrenadantes y pellets de 10000 x g de células luteales provenientes de ratas control (C), diabéticas (D) y diabéticas tratadas con insulina (Ins). Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.





**Figura 13.** Porcentaje de la actividad de fosfodiesterasa (en pmol/min) en sobrenadantes y pellets de 10000 x g de células luteales provenientes de ratas control (C), diabéticas (D) y diabéticas tratadas con insulina (Ins).

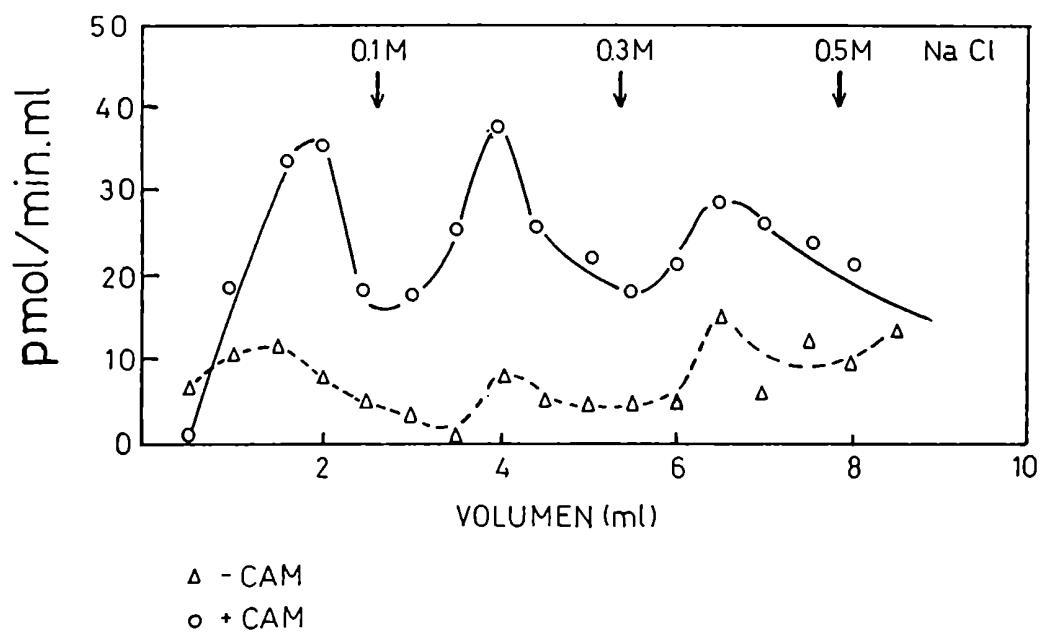
Resultaba interesante averiguar si las células luteales provenientes de animales de los grupos D e Ins respondían a la insulina *in vitro* con un aumento de su actividad de PDE, tal como se había descrito en células obtenidas de ratas controles [391]. Para ello, se incubaron células luteales de los grupos C, D e Ins ( $3 \times 10^6$  células/ml) durante 10 min a 37°C en DMEM-HEPES con BSA 0,1% en presencia o ausencia de insulina 2 nM. Esta concentración de la hormona produce máxima estimulación de la actividad de PDE en células luteales obtenidas de ratas controles. Se observó que las células luteales provenientes de ratas de los grupos C y D respondieron a la insulina *in vitro* con un aumento de la actividad de PDE (% de estimulación de la actividad específica: C= 75%, D= 110%). Por el contrario, en células aisladas de ratas del grupo Ins, la hormona produjo una inhibición de la actividad de PDE (% de inhibición de la actividad específica: 48%).

Con el objeto de caracterizar la PDE, se realizó una cromatografía de intercambio iónico de los extractos crudos ensayados anteriormente. Las fracciones citosólicas de células luteales de los grupos C, D e Ins fueron sembradas en una columna de DEAE-celulosa, que fue eluida con un gradiente discontinuo de NaCl (0,1 a 0,5 M). Se determinó luego la actividad de PDE en las distintas fracciones. En las Figuras 14 a 16 se observan los perfiles de elución obtenidos. En los tres grupos experimentales se resuelven dos picos de actividad que eluyen con 0,1 M y 0,3 M de NaCl. En el extracto proveniente de ratas controles se obtuvo en algunos experimentos un tercer pico que eluye con los lavados con el buffer de siembra y que sería consecuencia de una carga excesiva de la columna. La actividad de PDE de las distintas fracciones aumenta en presencia de  $Ca^{++}$  y calmodulina en los tres grupos experimentales. Sin embargo, la estimulación fue mucho menor en los extractos

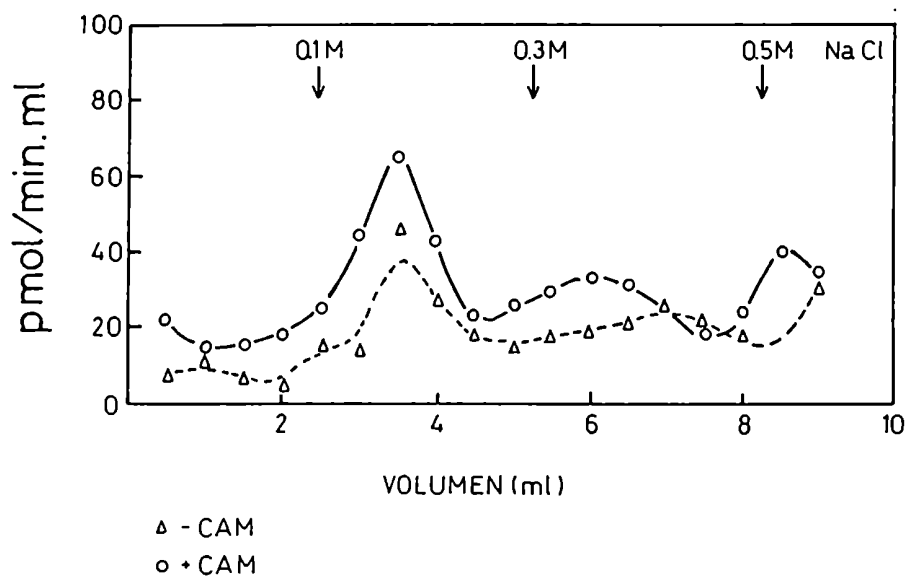
provenientes de ratas D e Ins que en los extractos controles (Figuras 14 a 16 y Tabla 1).

Para determinar los parámetros cinéticos de la PDE luteal, la enzima se ensayó a distintas concentraciones de sustrato. Para ello, se agruparon las fracciones correspondientes al segundo pico de actividad de cada grupo y se determinó la actividad de PDE a concentraciones variables de  $^3\text{H-AMPc}$  (entre  $0,05 \mu\text{M}$  y  $0,1 \text{mM}$ ). En los tres casos se obtuvieron gráficos de Lineweaver-Burk no lineales con dos sitios aparentes de hidrólisis de AMPc, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad (Figuras 17 a 19). Las  $K_m$  de la PDE proveniente de células luteales de ratas controles, diabéticas o diabéticas tratadas con insulina resultaron similares. En cambio, la  $V_{max2}$  de la enzima fue más alta en células luteales de los grupos D e Ins (Tabla 2).

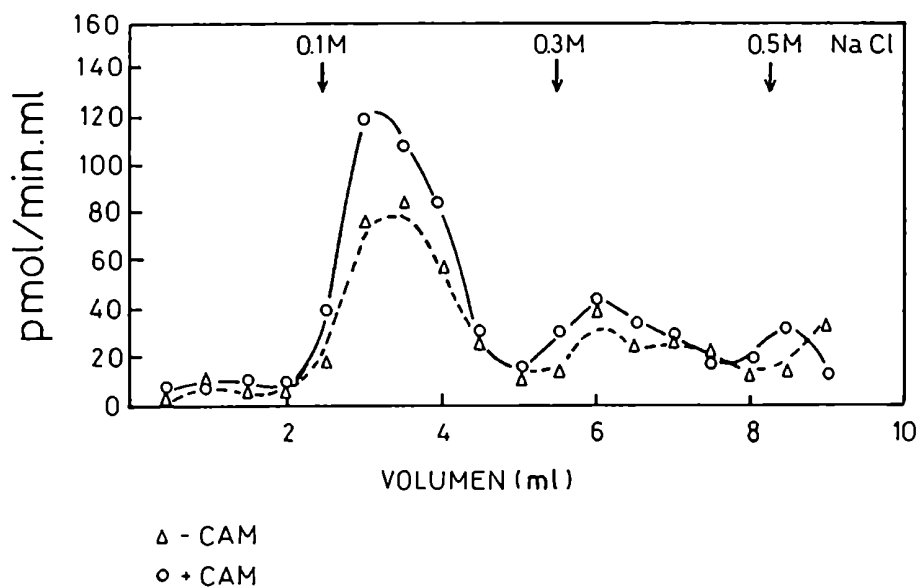
La mayor actividad de la PDE en células luteales de animales diabéticos y diabéticos tratados con insulina respecto de los controles podría deberse a niveles más elevados en estas células del AMPc intraovárico. En efecto, la inducción por sustrato de las fosfodiesterasas ha sido demostrada en distintos tipos celulares, incluyendo las células de granulosa de rata [28,71,76,242,355]. En base a estos datos resultaba de gran interés la medición de los niveles endógenos de AMPc en cuerpos lúteos provenientes de animales C, D e Ins. En la Figura 20 se observan los resultados obtenidos. La concentración endógena del nucleótido cíclico, medida por RIA, no muestra diferencias significativas entre los grupos C, D e Ins. Por lo tanto, el aumento en la actividad de PDE observado en células luteales obtenidas de ratas diabéticas no se debería a una activación de la enzima por sustrato.



**Figura 14.** Cromatografía en DEAE-celulosa de la actividad de fosfodiesterasa de células luteales obtenidas de ratas control. La actividad enzimática se determinó en presencia de  $\text{CaCl}_2$  25  $\mu\text{M}$  (-CAM) o  $\text{CaCl}_2$  25  $\mu\text{M}$  y calmodulina de cerebro bovino 20  $\mu\text{g/ml}$  (+CAM).



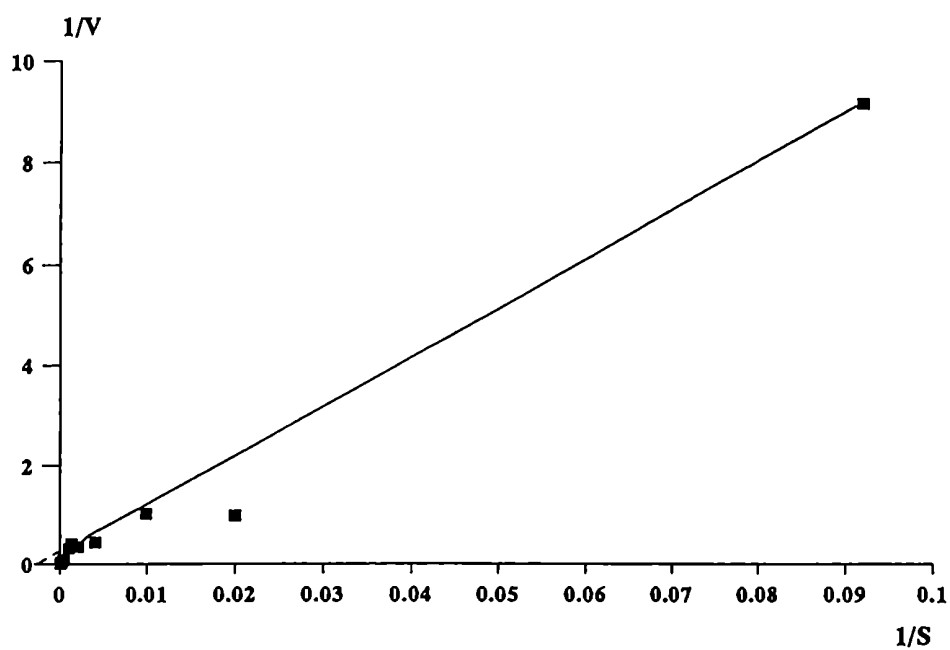
**Figura 15.** Cromatografía en DEAE-celulosa de la actividad de fosfodiesterasa de células luteales obtenidas de ratas diabéticas. La actividad enzimática se determinó en presencia de  $\text{CaCl}_2$  25  $\mu\text{M}$  (-CAM) o  $\text{CaCl}_2$  25  $\mu\text{M}$  y calmodulina de cerebro bovino 20  $\mu\text{g/ml}$  (+CAM).



**Figura 16.** Cromatografía en DEAE-celulosa de la actividad de fosfodiesterasa de células luteales obtenidas de ratas diabéticas tratadas *in vivo* con insulina. La actividad enzimática se determinó en presencia de  $\text{CaCl}_2$  25  $\mu\text{M}$  (-CAM) o  $\text{CaCl}_2$  25  $\mu\text{M}$  y calmodulina de cerebro bovino 20  $\mu\text{g/ml}$  (+CAM).

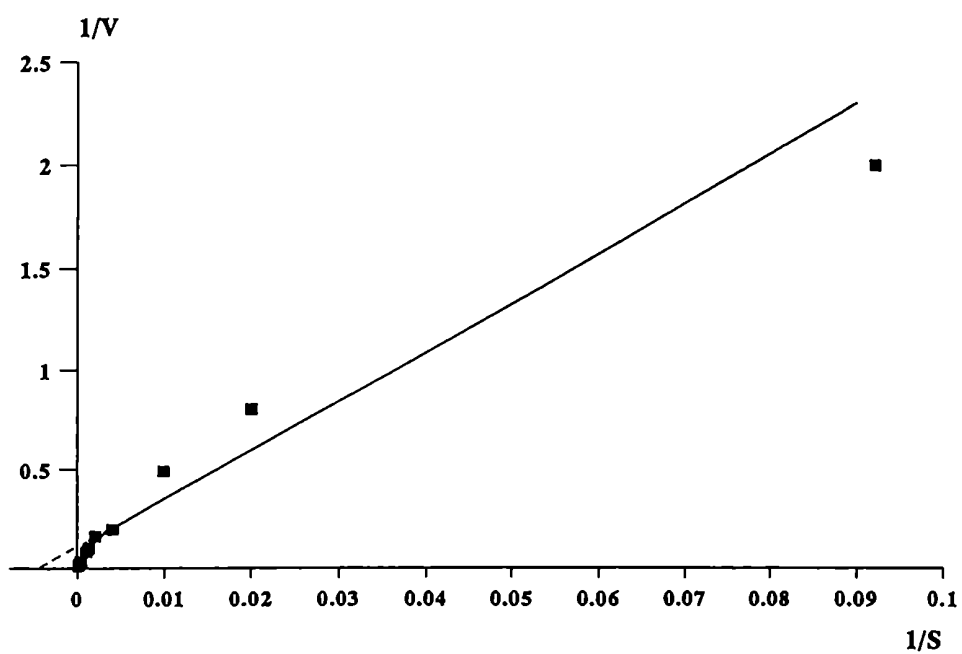
Grupo	Pico	Actividad (pmol/min.mg)	
		CaCl <sub>2</sub> 25 μM	CaCl <sub>2</sub> 25 μM + 20 μg/ml CAM
C	I	12,05	74,66
	II	32,11	72,04
D	I	308,76	576,28
	II	280,73	276,95
Ins	I	252,65	387,45
	II	471,00	552,05

**Tabla 1.** Efecto del complejo Ca<sup>++</sup>-calmodulina sobre la actividad específica de fosfodiesterasa en los dos picos de la columna de DEAE-celulosa para los tres grupos experimentales. Se determinó la actividad específica de PDE en las fracciones correspondientes a los picos de la cromatografía de intercambio iónico en presencia de CaCl<sub>2</sub> 25 μM o CaCl<sub>2</sub> 25 μM + calmodulina de cerebro bovino 20 μg/ml.

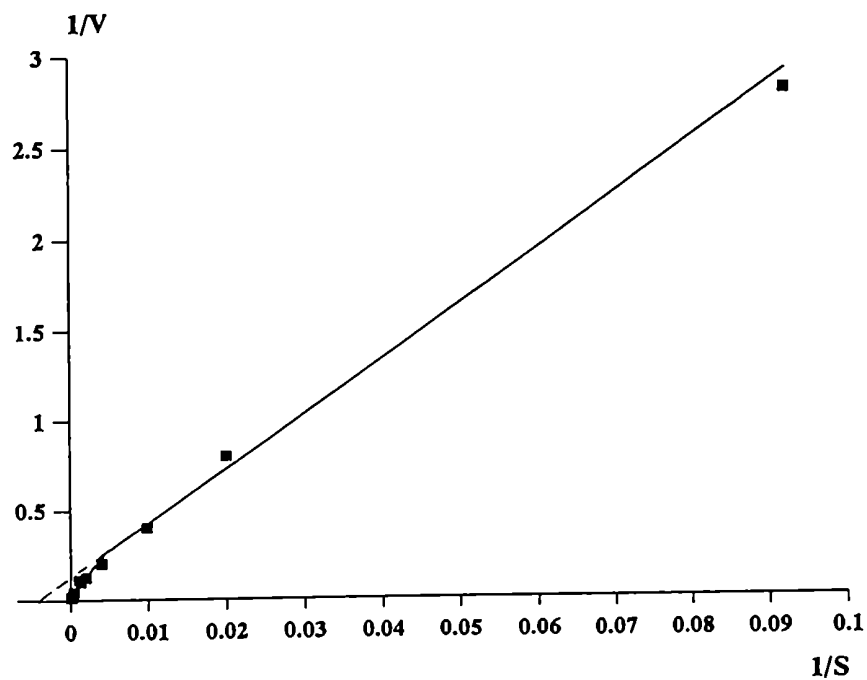


**Figura 17.** Gráfico doble recíproco (Lineweaver-Burk) de la actividad de fosfodiesterasa de células luteales provenientes de ratas control.  $V$  se expresa en  $\mu\text{mol}/\text{min}$  y  $S$  (concentración de AMPc), en  $\mu\text{moles}/\text{tubo}$ .





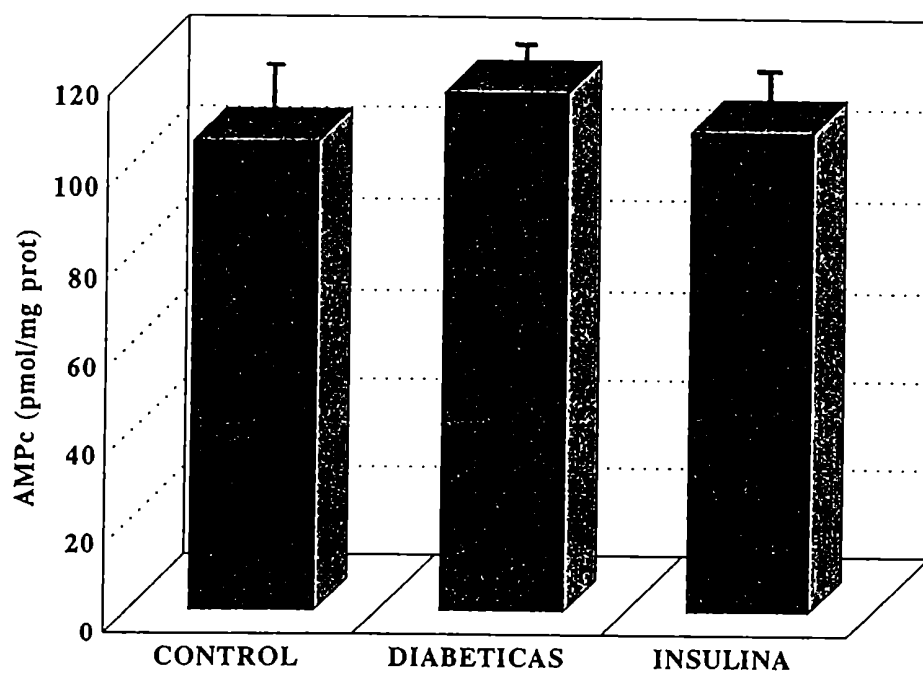
**Figura 18.** Gráfico doble recíproco (Lineweaver-Burk) de la actividad de fosfodiesterasa de células luteales provenientes de ratas diabéticas. V se expresa en pmol/min y S (concentración de AMPc), en pmoles/tubo.



**Figura 19.** Gráfico doble recíproco (Lineweaver-Burk) de la actividad de fosfodiesterasa de células luteales provenientes de ratas diabéticas tratadas con insulina.  $V$  se expresa en pmol/min y  $S$  (concentración de AMPc), en pmoles/tubo.

<b>GRUPOS</b>	<b>Km1 (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Vm1 (nmol/min.mg)</b>	<b>Km2 (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Vm2 (nmol/min.mg)</b>
<b>C</b>	<b>4.4</b>	<b>0.44</b>	<b>90</b>	<b>4.2</b>
<b>D</b>	<b>2.3</b>	<b>0.44</b>	<b>106</b>	<b>8.8</b>
<b>Ins</b>	<b>2.8</b>	<b>0.55</b>	<b>80</b>	<b>6.7</b>

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos de la fosfodiesterasa de células luteales de los grupos C, D e Ins. Los valores de Km y Vmax se obtuvieron de los gráficos de Lineweaver-Burk mostrados en las Figuras 17 a 19.



**Figura 20.** Niveles de AMPc endógeno en ovarios enteros obtenidos de ratas controles, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina. Luego de una precipitación con TCA 20% y sucesivas extracciones del sobrenadante con éter etílico, el nucleótido cíclico fue dosado en la fase acuosa por radioinmunoensayo.

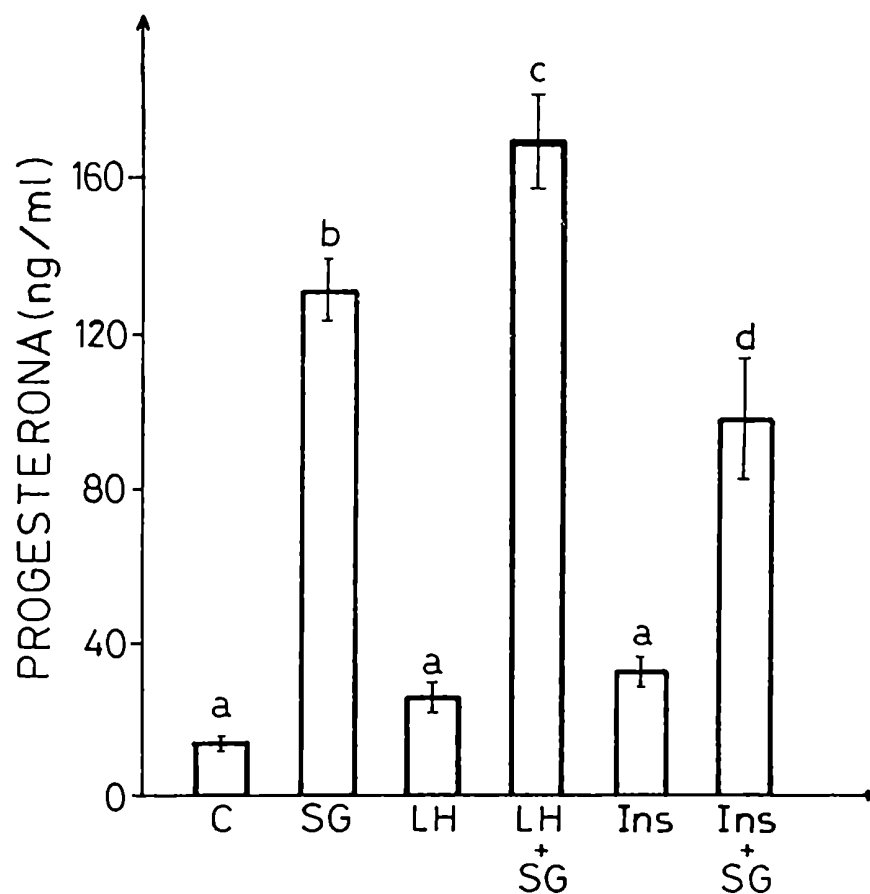
## **Capítulo 2: Acción de la insulina in vitro sobre células luteales**

### **2.1. Efecto de un sistema generador de NADPH sobre células luteales.**

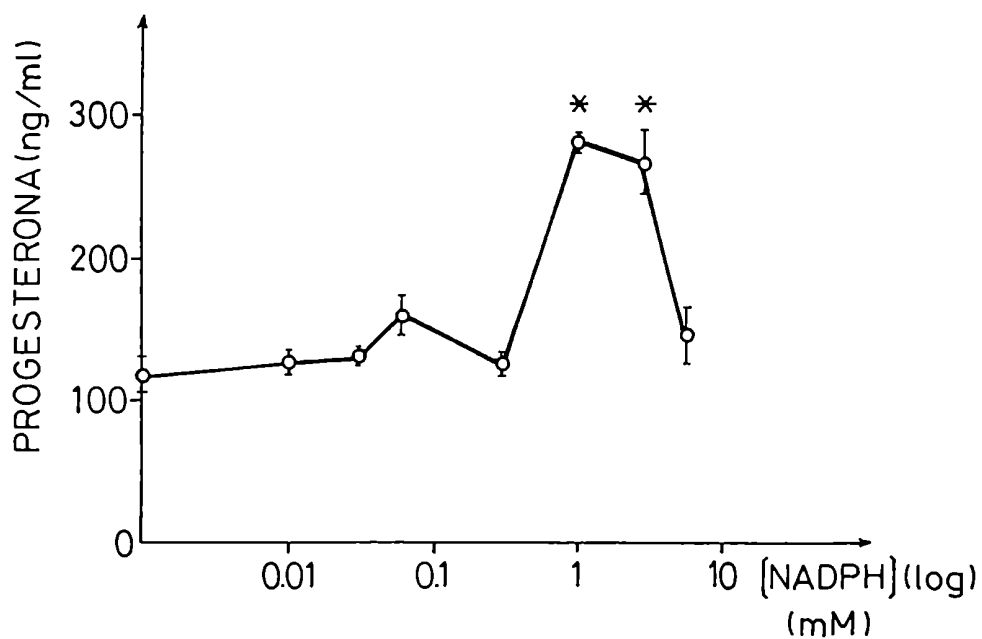
#### **Modulación por LH e insulina**

Con el objeto de continuar estudios previos del laboratorio acerca de las acciones de la insulina sobre cuerpo lúteo de rata, se estudió el efecto de un sistema generador de NADPH (SG) sobre la esteroidogénesis en células luteales y la posible modulación de este efecto por la insulina. Con fines comparativos, se ensayó también la acción de la LH. La hipótesis de trabajo fue que el agregado de cofactores esenciales para las enzimas esteroidogénicas, y en particular para la SCC, podría aumentar la respuesta de las células luteales a la insulina. Para ello, células luteales (250.000 células en 0,5 ml) obtenidas de ratas prepúberes superovuladas se incubaron en DMEM-HEPES con BSA 0,5% durante 3 hs a 37°C en presencia del SG. Este consistió en: NADP<sup>+</sup> 1 mM, D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1 UI, D-glucosa-6-fosfato 5 mM [42]. Se incluyeron también hLH (10 ng/ml) o insulina (10 ng/ml). Estas concentraciones hormonales producen la máxima estimulación de la producción de progesterona en células luteales de rata [216]. En la Figura 21 se observan los niveles de P obtenidos: la presencia del SG en el medio de incubación produjo un incremento significativo de la acumulación de progesterona (8,7 veces). La LH amplificó el efecto estimulador del SG, mientras que el agregado de insulina al SG produjo una inhibición significativa de la acumulación de progesterona.

Para confirmar que el NADPH generado enzimáticamente era el responsable de los cambios observados en la producción de progesterona, se reemplazó el SG por NADPH (Fig. 22). Se observó que el cofactor reducido aumentó



**Figura 21.** Niveles de progesterona liberada por células luteales incubadas en presencia de distintos estímulos. Las células fueron incubadas durante 3 hs a 37°C en DMEM-HEPES con BSA 0,5% en presencia de LH (10 ng/ml), insulina (Ins; 10 ng/ml) o sistema generador de NADPH (SG) o de SG y cada una de las hormonas mencionadas. Los valores con letras distintas difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).



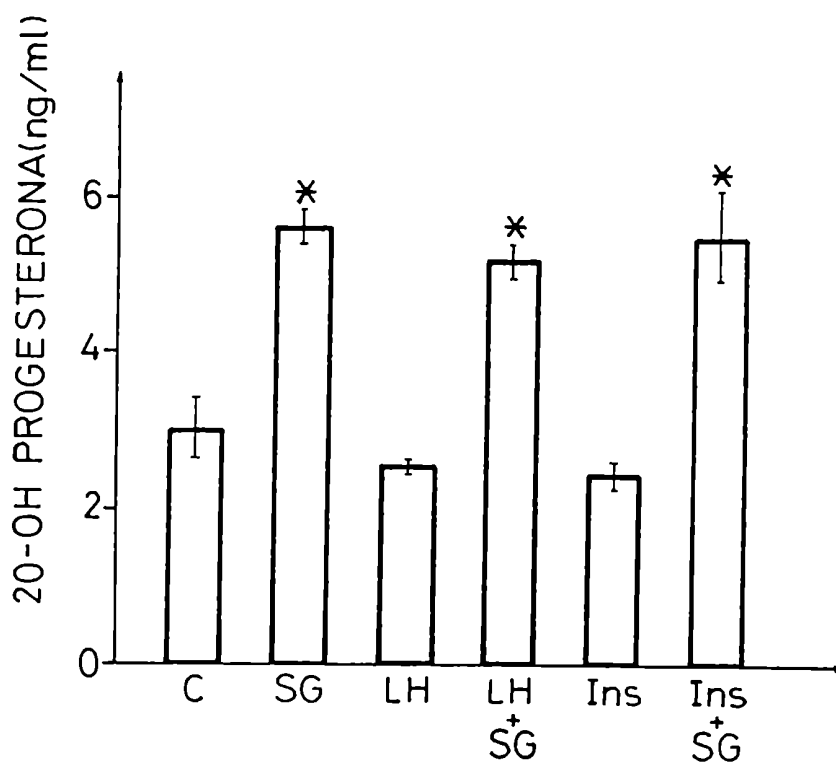
**Figura 22.** Efecto de concentraciones crecientes de NADPH sobre la acumulación de progesterona en células luteales. Las células fueron incubadas durante 3 hs a 37°C en DMEM-HEPES con distintas concentraciones de NADPH. La progesterona producida se dosó de los medios de incubación por radioinmunoensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al valor basal.

los niveles de progesterona en los medios de incubación de células luteales, aunque la concentración de NADPH necesaria para esta estimulación fue mayor que la que se requiere de  $\text{NADP}^+$  en el caso de utilizar el sistema generador de NADPH. Además, el efecto observado resultó bifásico, ya que los niveles de progesterona descendieron a valores basales en incubaciones con NADPH 6 mM. Cuando en los medios de incubación se omitió alguno de los componentes del SG, ya sea el  $\text{NADP}^+$ , la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o la D-glucosa-6-fosfato no se observó el efecto descrito. Tampoco se encontró efecto alguno cuando se reemplazó el  $\text{NADP}^+$  por  $\text{NAD}^+$ . Esto sugiere que es necesaria la presencia de NADPH (ya sea generado enzimáticamente o agregado a las incubaciones) para estimular la producción de progesterona

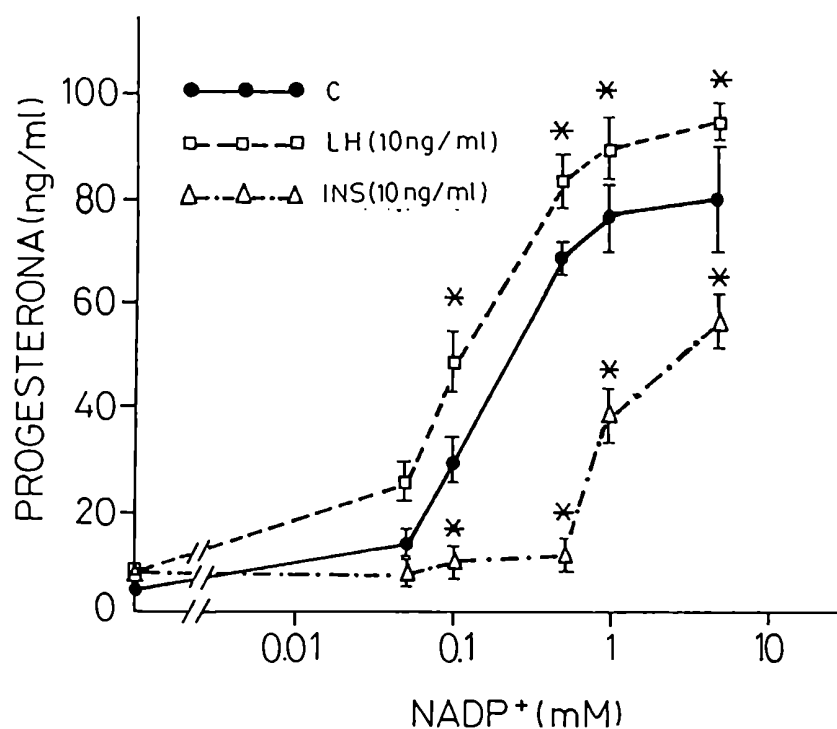
Para determinar si la acción estimuladora del SG sobre la acumulación de P por las células luteales estaba reflejando una disminución en la conversión de P a su principal metabolito en el ovario de rata, la 20-OH-P, se dosaron los niveles de este esteroide en los medios de incubación (Fig. 23). Se observó que los niveles basales de 20-OH-P eran mayores en presencia del SG. Además, ni la insulina ni la LH modificaron significativamente el efecto estimulador ejercido por el SG sobre la acumulación de 20-OH-P. Por lo tanto, la acción del SG no involucra una disminución en la metabolización de la P en células luteales, sino un aumento de su síntesis.

Se hizo luego una curva dosis-respuesta, incubando las células con concentraciones crecientes de SG en presencia o ausencia de hLH (10 ng/ml) o insulina (10 ng/ml). En la Figura 24 se muestran los niveles de P en los medios de incubación de estas células. El agregado del SG produjo un incremento significativo de la acumulación de P desde una concentración de  $\text{NADP}^+$  0,1 mM, alcanzándose la





**Figura 23.** Niveles de 20-OH-P liberada por incubaciones de células luteales en presencia de distintos estímulos. Las células fueron incubadas durante 3 hs a 37°C en DMEM-HEPES con BSA 0,5% en presencia de LH (10 ng/ml), insulina (Ins; 10 ng/ml), sistema generador de NADPH (SG) o combinaciones de estos estímulos. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.



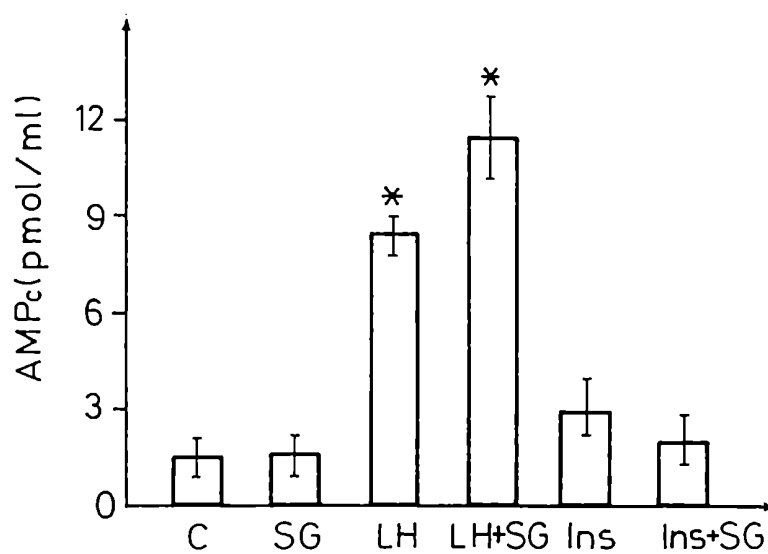
**Figura 24.** Efecto de dosis crecientes de SG solo (C) o en combinación con LH (10 ng/ml) o insulina (INS; 10 ng/ml) sobre la acumulación de progesterona en células luteales. Las células fueron incubadas durante 3 hs a 37°C en DMEM-HEPES con BSA 0,5% en presencia de los diferentes estímulos. La progesterona producida se dosó de los medios de incubación por radioinmunoensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a los respectivos controles.

máxima estimulación con  $\text{NADP}^+$  1 mM. En todas las concentraciones estimuladoras de SG ensayadas, la insulina (10 ng/ml) resultó inhibitoria de la acción del cofactor, mientras que la LH (10 ng/ml) amplificó el efecto del sistema generador de NADPH, aun cuando se alcanzó la máxima estimulación con  $\text{NADP}^+$  1 mM.

Varios estudios describieron receptores de adenosina en células luteales de rata y un incremento en la producción de AMPc como respuesta a la *estimulación in vitro* con adenosina [41,373]. Para descartar una posible interacción entre el NADPH y los receptores de adenosina, se midieron por RIA los niveles de AMPc liberado en incubaciones de células luteales en presencia de los distintos estímulos (Fig. 25). Se observó que solamente en presencia de LH se produjo un incremento significativo (7 veces) de la producción luteal de AMPc sobre los valores controles.

El paso limitante en la biosíntesis de esteroides es la conversión del colesterol a pregnenolona, catalizada por el sistema enzimático mitocondrial de ruptura de la cadena lateral del colesterol (SCC). Para estudiar si la acción del NADPH se ejercía sobre esta enzima, se midió la pregnenolona producida por las células luteales, empleando dos inhibidores de la biosíntesis de esteroides. Uno de ellos, la aminoglútimida (AG), es un inhibidor competitivo de la SCC [86], mientras que la cianocetona (CK) inhibe tanto *in vivo* como *in vitro* a la  $3\beta$ -HSD, que interviene en la conversión de pregnenolona a P [135,284].

Las células estimuladas por el SG mostraron niveles significativamente más altos no sólo de P, sino también de pregnenolona que las controles. El agregado de AG (1 mM) al SG revirtió el aumento de los niveles de P, que resultaron iguales a los basales, mientras que los niveles de pregnenolona disminuyeron significativamente respecto de los valores obtenidos en presencia de SG solo, pero

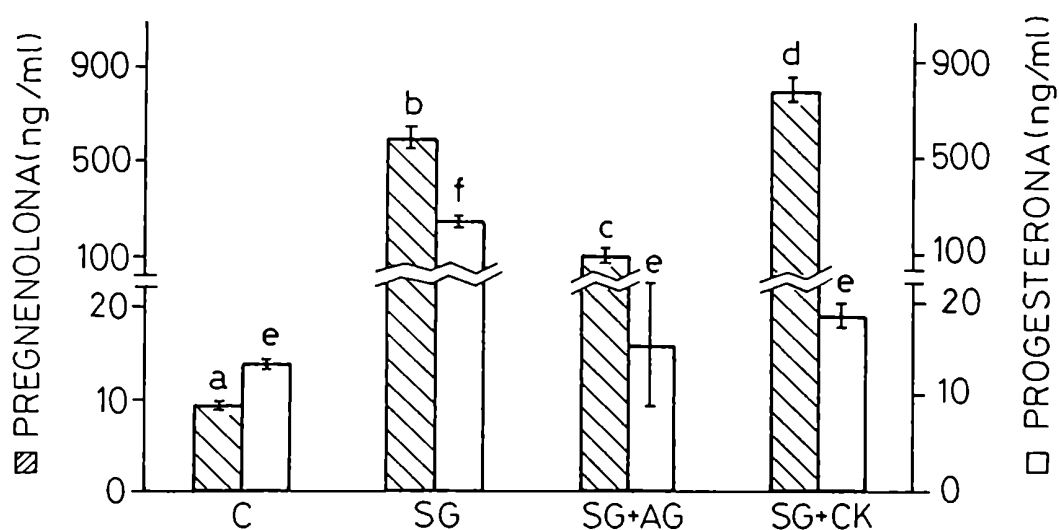


**Figura 25.** Niveles de AMPc liberado en incubaciones de células luteales. Las células fueron incubadas durante 3 hs a 37°C en DMEM-HEPES con BSA 0,5% en presencia de los diferentes estímulos. El AMPc producido se dosó de los medios de incubación por radioinmunoensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

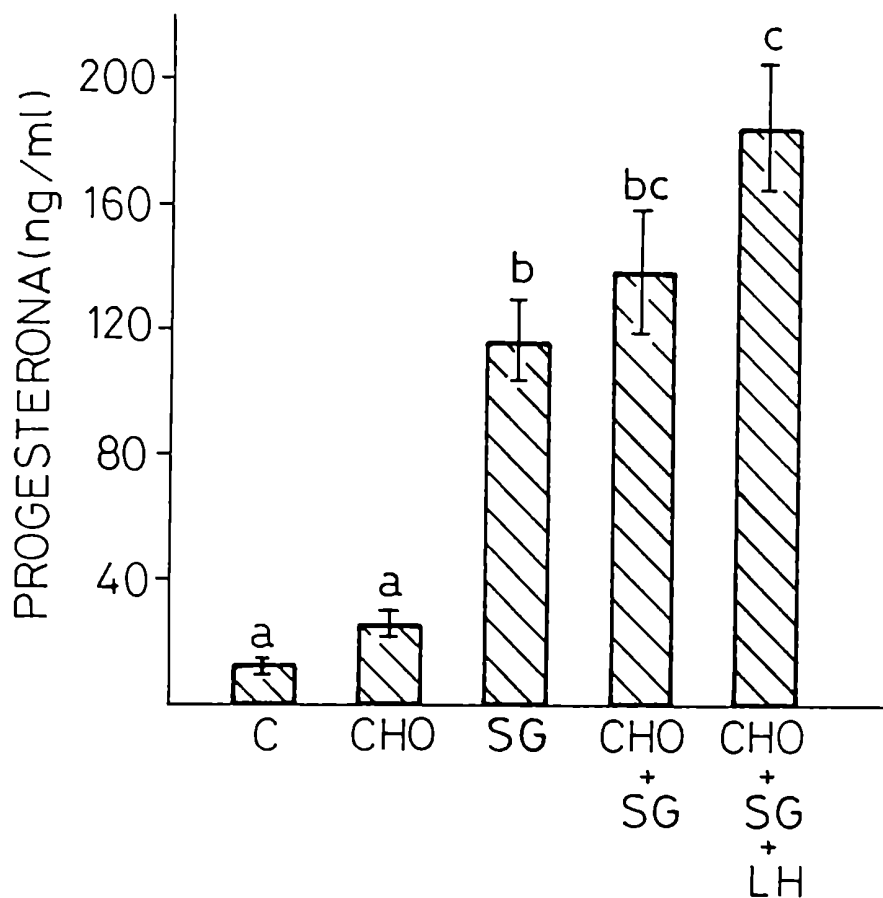
siguieron siendo más altos que los basales. Por su parte, la CK (0,5 mM) redujo la producción de P como consecuencia de la acumulación de pregnenolona (Fig. 26). Estos resultados confirman que el sitio de acción del NADPH es entre colesterol y pregnenolona, es decir en la ruptura de la cadena lateral del colesterol.

Para investigar si la presencia de un sustrato esteroideogénico exógeno podía modificar la respuesta de las células luteales al SG, las células se incubaron con 25-hidroxi-colesterol (CHO; 10 µg/ml). Este análogo polar del colesterol es un mejor sustrato que el colesterol, presumiblemente debido a su fácil acceso a la mitocondria [393]. El agregado de CHO, tanto a incubaciones con SG como sin SG, produjo un incremento pequeño y no significativo en la producción de P respecto de sus respectivos controles (Fig. 27). Sin embargo, la adición simultánea de LH y CHO produjo un aumento de la respuesta máxima alcanzada con el SG, sugiriendo que dicho sustrato puede ser utilizado si el sistema enzimático SCC es activado por acción de la LH.

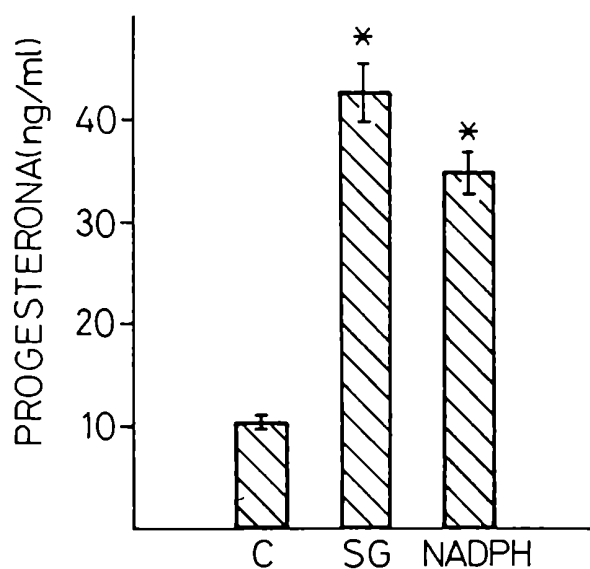
Se quiso determinar si el efecto estimulador del SG era consecuencia de la acción del cofactor sobre células dañadas durante la digestión con colagenasa o si el NADPH generado podía entrar a células intactas. Para ello, las células luteales se purificaron en un gradiente de densidad de Percoll y luego se sembraron en placas de cultivo precubiertas con suero fetal bovino. A las 16 hs se cambiaron los medios de cultivo y se agregaron los distintos estímulos por 3 hs. La ventaja de este sistema es que se asegura la integridad celular, ya que el gradiente de Percoll permite separar los restos celulares y, por otro lado, en cultivo sólo las células intactas pueden adherirse a las placas. En la Figura 28 se muestra el efecto del SG y de NADPH (1 mM) sobre la producción de P en células luteales en cultivo. Se puede observar que tanto el SG como el NADPH elevaron significativamente los niveles de P secretada por las



**Figura 26.** Acumulación de pregnenolona y progesterona en incubaciones de células luteales incubadas con sistema generador de NADPH (SG), SG + aminoglutetimida (AG; 1 mM) y SG + cianocetona (CK; 0,5 mM). Las células se incubaron durante 3 hs a 37°C y los esteroides producidos se dosaron directamente de los medios de incubación por RIA. Los valores con letras distintas difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 27.** Efecto del 25-hidroxi-colesterol (CHO) sobre la acción estimuladora del SG. Las células fueron incubadas en DMEM-HEPES con BSA 0,5% con el agregado de CHO (10  $\mu\text{g/ml}$ ), GS (NADP<sup>+</sup> 1 mM), LH (10 ng/ml) o combinaciones de estos estímulos. Los valores con letras distintas difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 28.** Efecto del sistema generador de NADPH (SG) y del NADPH (1 mM) sobre la acumulación de progesterona de células luteales en cultivo. Las células se purificaron por un gradiente discontinuo de Percoll y se sembraron en placas recubiertas con suero fetal bovino (500.000 células/well). La progesterona producida se dosó por radioinmunoensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

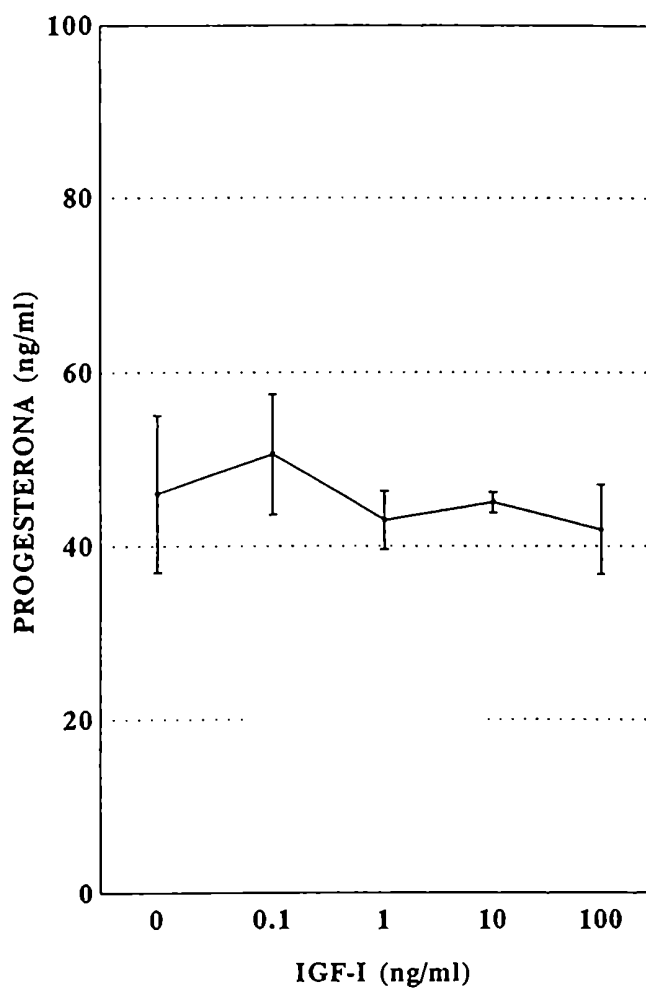


células. Este incremento fue menor que el observado en incubaciones cortas de células no purificadas (4 veces vs 9 veces), probablemente como resultado de la presencia de células dañadas en la preparación celular no purificada, lo cual permite un mejor acceso del cofactor a las enzimas involucradas en la esteroidogénesis. Estos resultados demuestran que el NADPH atraviesa la membrana plasmática de células luteales intactas y ejerce su acción estimuladora sobre la producción de progesterona.

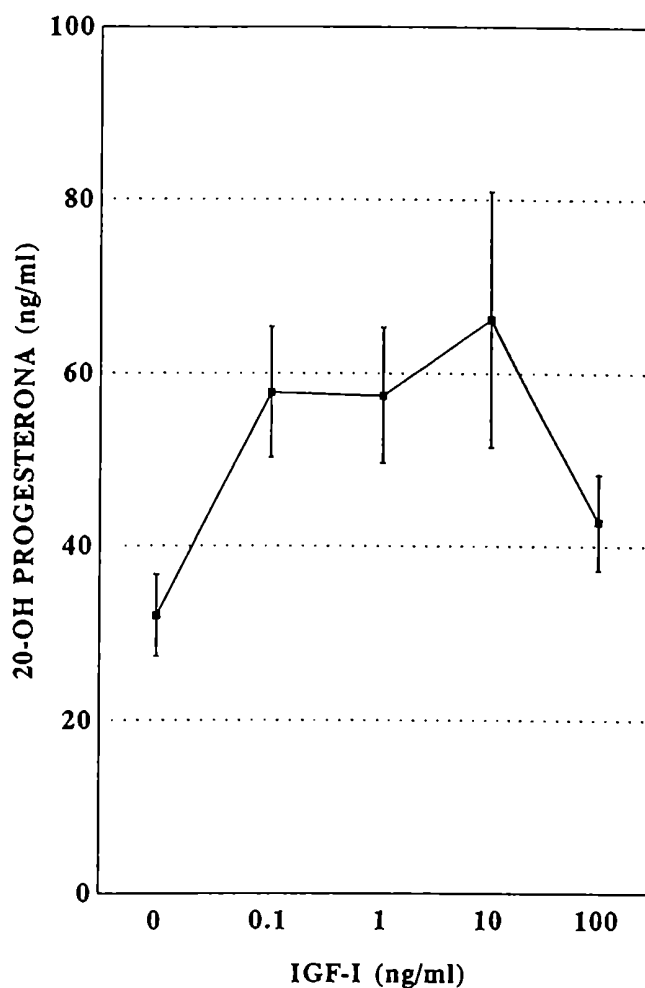
## **2.2. Comparación de los efectos de la insulina y el IGF-I sobre la esteroidogénesis en células luteales**

Recientemente, se ha demostrado en células luteales de rata que el IGF-I y su receptor se expresan [303] y que el factor de crecimiento tiene un efecto estimulador sobre la biosíntesis de P [385]. A partir de estos antecedentes se quiso conocer el efecto del IGF-I sobre células luteales en cultivo y en incubaciones cortas y compararlo con la acción de la insulina en ambos diseños experimentales.

En la Figura 29 se muestra la secreción de P en respuesta a IGF-I de células luteales obtenidas de ratas prepúberes superovuladas por tratamiento con gonadotrofinas. Las células fueron incubadas durante 3 hs a 37°C en DMEM-HEPES con BSA 0,5% en presencia de concentraciones crecientes de IGF-I (0,01-100 ng/ml). Se observa que el factor de crecimiento no provoca modificaciones significativas de los niveles de progesterona respecto al valor basal. En la Figura 30 se grafican los niveles de 20-OH-P en las mismas condiciones que la figura anterior. Si bien en este caso los niveles de 20-OH-P se duplicaron en presencia de IGF-I, la diferencia no resultó significativa.



**Figura 29.** Efecto del IGF-I sobre la acumulación de progesterona por células luteales de rata. Las células fueron incubadas durante 3 hs a 37°C en DMEM-HEPES con BSA 0,5% en presencia de concentraciones crecientes de IGF-I. La progesterona producida se dosó directamente de los medios de incubación por medio de un radioinmunoensayo específico.



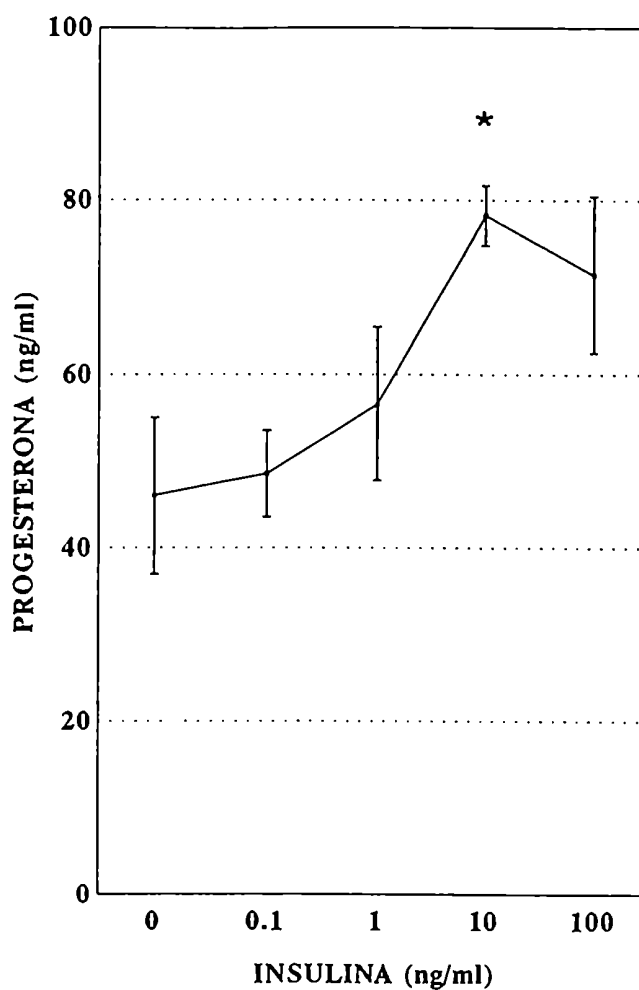
**Figura 30.** Efecto del IGF-I sobre la producción de 20-OH-P por células luteales de rata. Las células fueron incubadas durante 3 hs a 37°C en DMEM-HEPES con BSA 0,5% en presencia de concentraciones crecientes de IGF-I. La 20-OH-P producida se dosó directamente de los medios de incubación por medio de un radioinmunoensayo específico.

Los niveles de progesterona de células luteales incubadas durante 3 hs con distintas concentraciones de insulina se muestran en la Figura 31. Se observa que la hormona estimula significativamente la acumulación de P a una concentración de 10 ng/ml. En la Figura 32 se observan los niveles de 20-OH-P en las mismas condiciones. También en este caso una concentración de 10 ng/ml de insulina aumenta significativamente la producción de 20-OH-P.

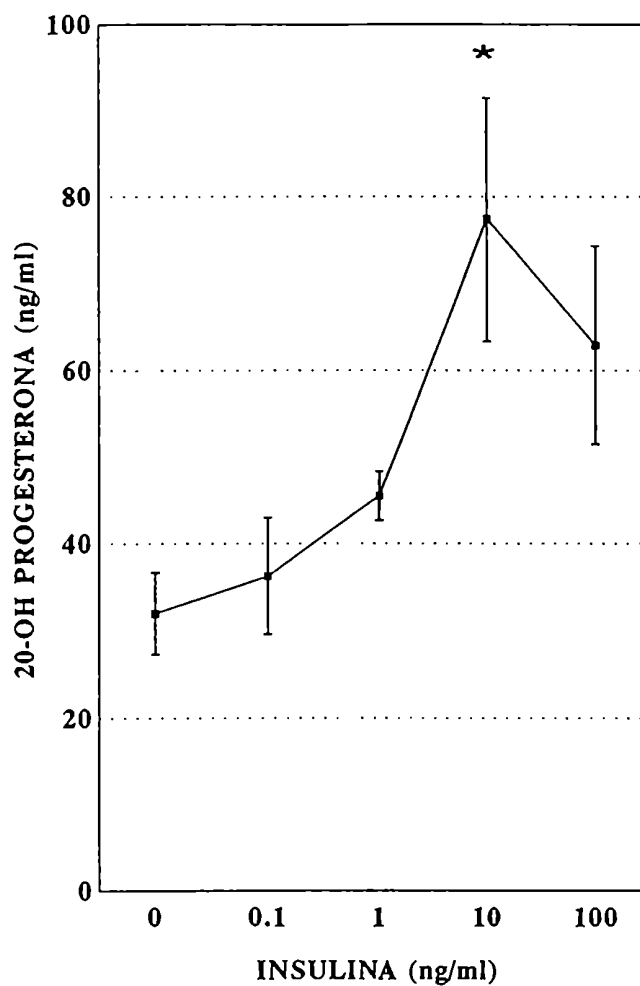
Se ensayó luego el efecto del IGF-I y de la insulina sobre células luteales en cultivo. Las células (500.000 células en 0,35 ml) fueron sembradas en placas precubiertas con suero fetal bovino. A las 16 hs se cambiaron los medios de cultivo y se agregaron distintas concentraciones de insulina o IGF-I por 24 hs. En la Figura 33 se observan los niveles de P en respuesta al IGF-I. Se encontró una estimulación de la acumulación de P, pero solamente a la mayor dosis ensayada (100 ng/ml). Los niveles de 20-OH-P en las mismas condiciones resultaron más altos que el valor basal, pero nuevamente el aumento no resultó significativo (Fig. 34).

La acción de la insulina sobre la secreción de progesterona de células luteales en cultivo se observa en la Figura 35. La insulina estimuló significativamente la acumulación de progesterona, alcanzándose la máxima estimulación a una concentración de insulina de 1 ng/ml; con concentraciones mayores de la hormona, la respuesta fue menor. En la Figura 36 se muestra la producción de 20-OH-P en las mismas condiciones. La insulina también estimuló significativamente la producción de 20-OH-P, aunque en este caso el efecto de la hormona no fue bifásico.

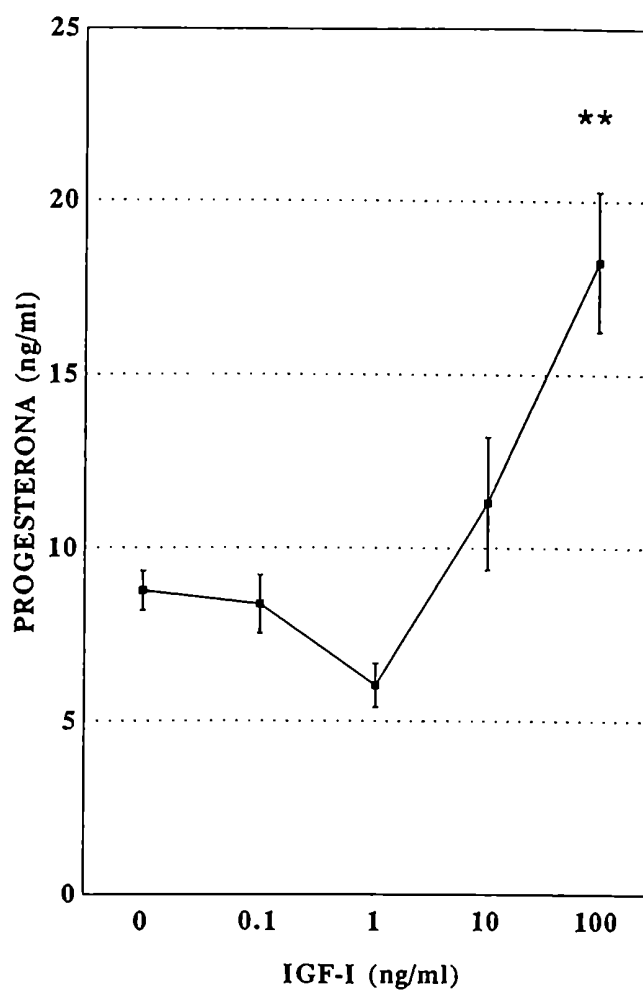
El efecto estimulador de la insulina sobre la producción de P y 20-OH-P en células luteales se observó a concentraciones de la hormona que coinciden con los valores circulantes reportados (0,2-1 nM), por lo que la modulación por insulina de la



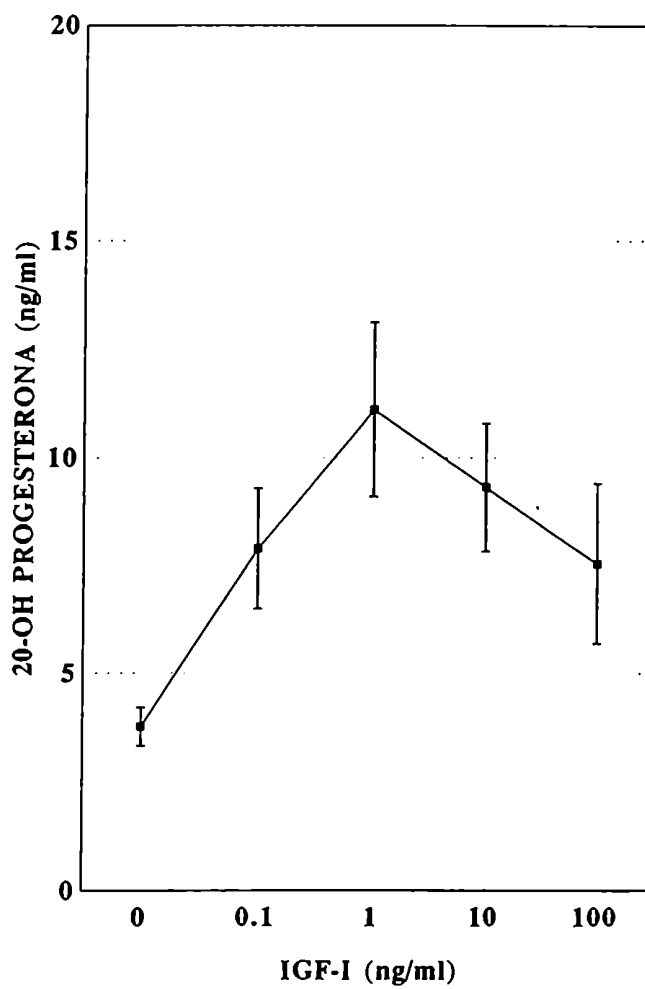
**Figura 31.** Efecto de la insulina sobre la acumulación de progesterona por células luteales de rata. Las células fueron incubadas durante 3 hs a 37°C en DMEM-HEPES con BSA 0,5% en presencia de concentraciones crecientes de insulina. La progesterona producida se dosó directamente de los medios de incubación por medio de un radioinmunoensayo específico. El asterisco indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al control.



**Figura 32.** Efecto de la insulina sobre la producción de 20-OH-P por células luteales de rata. Las células fueron incubadas durante 3 hs a 37°C en DMEM-HEPES con BSA 0,5% en presencia de concentraciones crecientes de insulina. La 20-OH-P producida se dosó directamente de los medios de incubación por medio de un radioinmunoensayo específico. El asterisco indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

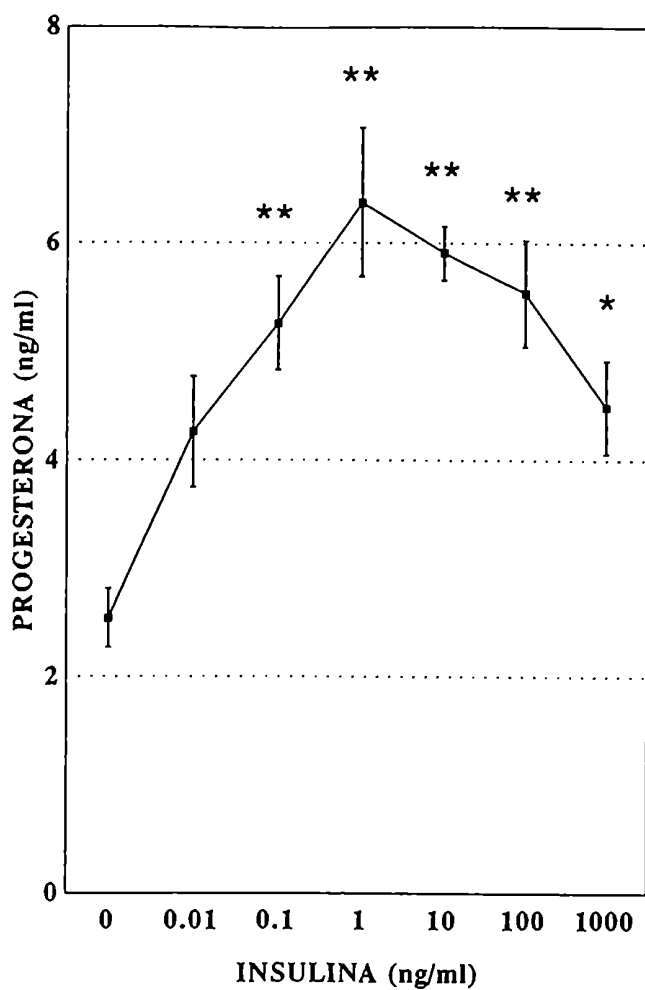


**Figura 33.** Efecto del IGF-I sobre la acumulación de progesterona por células luteales de rata en cultivo. El cultivo celular se realizó como se describió en Materiales y Métodos. La progesterona producida se dosó directamente de los medios de cultivo por radioinmunoensayo. Los dos asteriscos indican una diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) respecto al control.

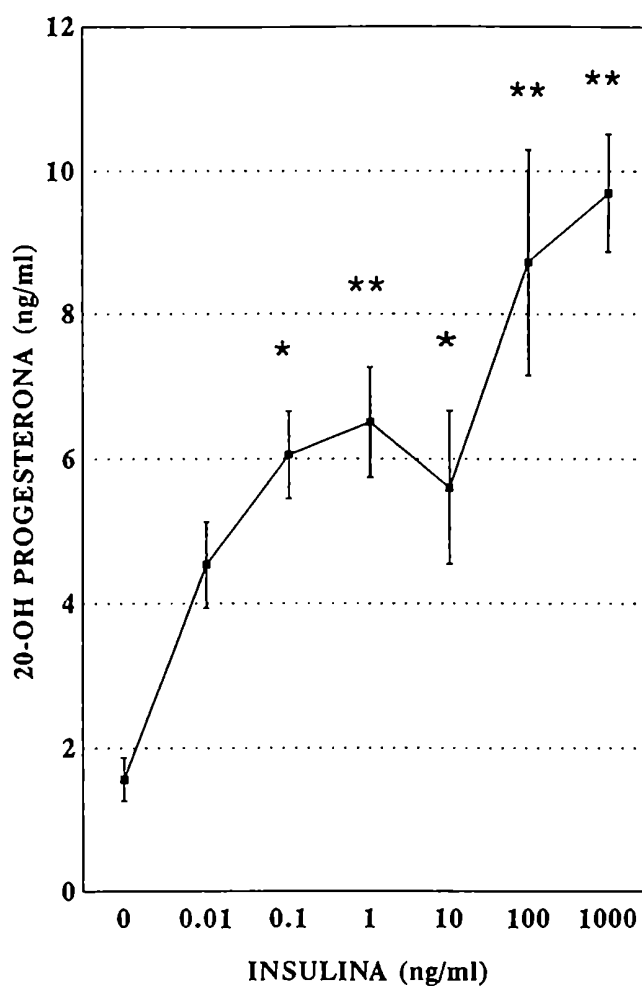


**Figura 34.** Efecto del IGF-I sobre la producción de 20-OH-P por células luteales de rata en cultivo. El cultivo celular se realizó como se describió en Materiales y Métodos. La 20-OH-P producida se dosó directamente de los medios de cultivo por radioinmunoensayo.





**Figura 35.** Efecto de la insulina sobre la acumulación de P por células luteales de rata en cultivo. El cultivo celular se realizó como se describió en Materiales y Métodos. La P producida se dosó directamente de los medios de cultivo por radioinmunoensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).



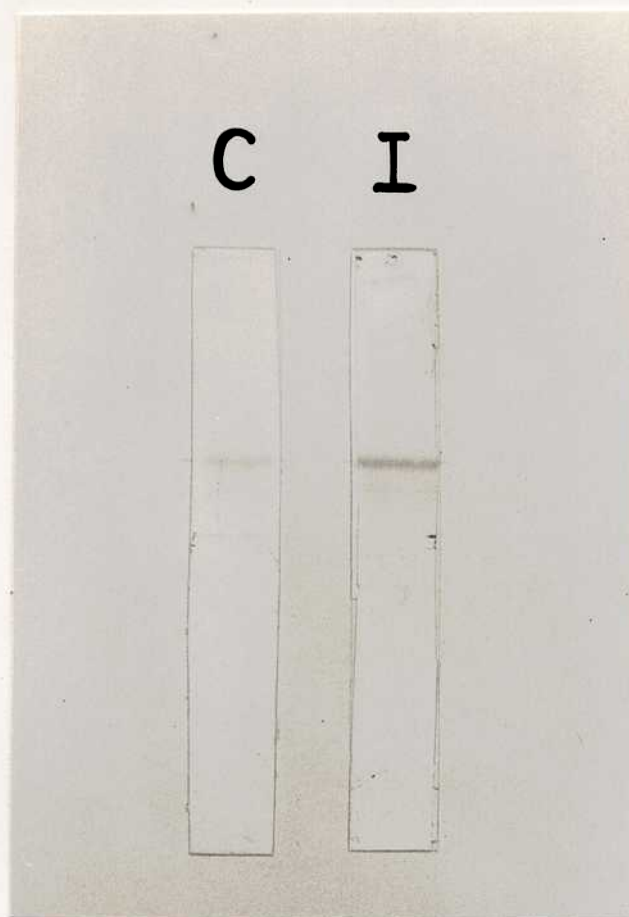
**Figura 36.** Efecto de la insulina sobre la producción de 20-OH-P por células luteales de rata en cultivo. El cultivo celular se realizó como se describió en Materiales y Métodos. La 20-OH-P producida se dosó directamente de los medios de cultivo por radioinmunoensayo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

esteroidogénesis estaría reflejando un fenómeno fisiológico. En cambio, el papel del IGF-I como regulador de la función luteal, por lo menos *in vitro*, parecería ser poco relevante.

### **2.3. Efecto de la insulina sobre el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub> en células luteales en cultivo**

Se quiso determinar si la insulina *in vitro* estimula la producción de progestágenos en células luteales a través de un aumento en el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub>. Para ello, se cultivaron células luteales en presencia o ausencia de insulina (10 ng/ml) durante 24 hs. Luego, las células fueron despegadas de las placas y se obtuvieron fracciones mitocondriales, que se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 10% con SDS e inmunoblot con un anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-citocromo P450<sub>SCC</sub> de adrenal bovina. Se obtuvo una única banda de peso molecular 56.000, que no se observó cuando se reemplazó el anticuerpo por suero normal de conejo. Esto indica que el anticuerpo utilizado reconoce al citocromo P450<sub>SCC</sub> de cuerpo lúteo de rata. Además, se observó un aumento en la cantidad de citocromo P450<sub>SCC</sub> en células luteales incubadas en presencia de insulina 10 ng/ml (Fig. 37).

Con el objeto de dilucidar si la insulina inducía este aumento como consecuencia de una estimulación de la síntesis *de novo* de la proteína, se estudió la incorporación de <sup>35</sup>S-metionina al citocromo P450<sub>SCC</sub> en cultivo de células luteales. Este cultivo fue realizado tanto en medio libre de suero, como en presencia de suero fetal bovino 10%, ya que la capacidad de las células de sintetizar proteínas en cantidades medibles podría depender de componentes del suero. A las 24 hs de cultivo, se dio a las células un pulso de <sup>35</sup>S-metionina de 5 hs, luego de deprivarlas



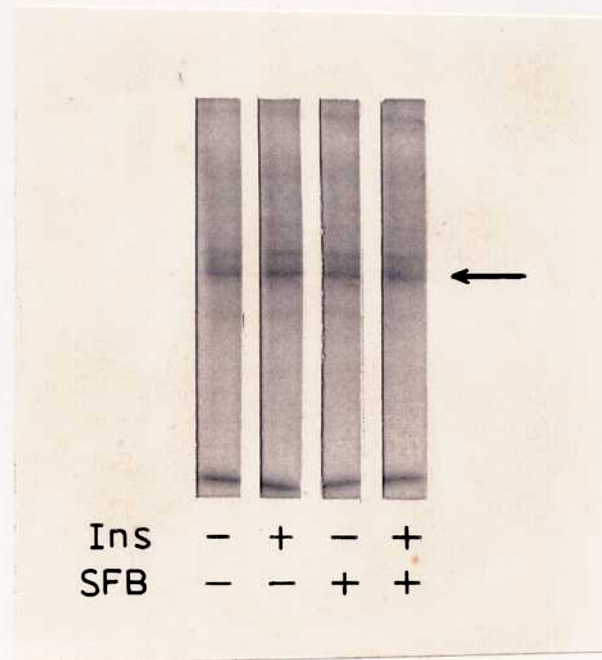
**Figura 37.** Efecto de la insulina sobre el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub> de células luteales en cultivo. Las células fueron incubadas con (I) o sin (C) insulina (10 ng/ml) durante 24 hs, al cabo de las cuales se descartaron los medios de cultivo, se homogeneizaron las células y se obtuvieron fracciones mitocondriales, que fueron resueltas en un gel de poliacrilamida 10% con SDS. Luego de transferir a membranas de nitrocelulosa, se reveló con un anticuerpo anti-citocromo P450<sub>SCC</sub>.

del aminoácido durante 2 hs. Durante estas 7 hs, las células continuaron en presencia del estímulo hormonal. Luego de lisar las células, se inmunoprecipitó el citocromo P450<sub>SCC</sub>, que fue luego separado de otras proteínas contaminantes por electroforesis en gel de poliacrilamida 10% con SDS.

En la Figura 38 se muestra la autorradiografía del gel. Se observan dos bandas mayoritarias que, una vez cuantificadas en un densitómetro, no mostraron diferencias entre los distintos tratamientos. La flecha señala la banda que corresponde al citocromo P450<sub>SCC</sub>, de acuerdo a su peso molecular. No se ha podido identificar a la otra banda, ni a las otras bandas minoritarias. La presencia del suero fetal bovino no afectó al parecer la síntesis *de novo* del citocromo P450<sub>SCC</sub>, que en el tiempo del pulso ensayado fue sintetizado en cantidades medibles por este método. Existía la posibilidad de que a tiempos más largos de estimulación se pudiera detectar un efecto estimulador de la insulina sobre la síntesis *de novo* del citocromo P450<sub>SCC</sub>. Sin embargo, cuando se cultivaron las células luteales en presencia de insulina durante 72 hs, tampoco se detectó ningún efecto sobre la síntesis del citocromo P450<sub>SCC</sub>. Con los resultados obtenidos no se puede concluir que la insulina aumente el contenido del citocromo P450<sub>SCC</sub> por un mecanismo que involucre la estimulación de la síntesis *de novo* de la proteína.

### **Capítulo 3: Efecto *in vivo* de la insulina sobre células luteales**

Se ensayó el efecto *in vivo* de la insulina sobre distintos parámetros funcionales del cuerpo lúteo. Se utilizaron ratas prepúberes inyectadas con insulina o vehículo durante 9 días y superovuladas por tratamiento con gonadotrofinas. Los animales fueron sacrificados una hora después de la última inyección de insulina. El dosaje de glucosa en sangre mostró que las ratas del grupo I eran hipoglucémicas:



**Figura 38.** Efecto de la insulina sobre la síntesis *de novo* del citocromo P450<sub>SCC</sub> de células luteales en cultivo. Las células fueron incubadas con o sin insulina (Ins; 10 ng/ml) durante 24 hs en medio libre de suero o con suero fetal bovino (SFB) 10%. Se dio un pulso de <sup>35</sup>S-metionina de 5 hs, al cabo de las cuales las células fueron lisadas y los lisados inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-citocromo P450<sub>SCC</sub>. Los inmunoprecipitados fueron sembrados en un gel de poliacrilamida 10% con SDS, que fue luego sometido a una autorradiografía. Se señala la banda correspondiente al citocromo P450<sub>SCC</sub>.

concentración sanguínea de glucosa (mg/dl) C=  $144 \pm 8$ ; I=  $51 \pm 6$  ( $p < 0,001$ ). La medición de la glucemia a tiempos más largos después de la última inyección de insulina permitió determinar que el estado euglucémico se alcanzó 6 hs después de la última inyección de la hormona.

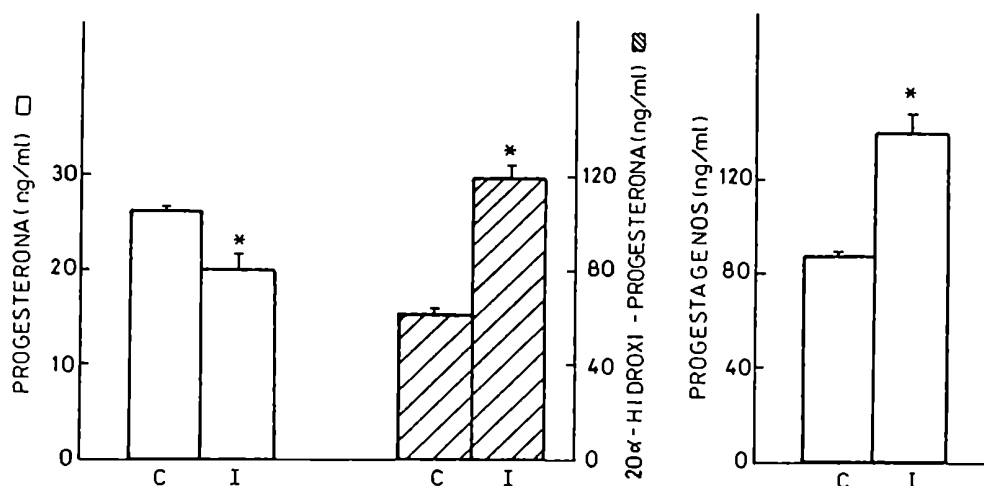
En la Tabla 3 se muestran algunos parámetros ováricos de las ratas controles (C) y tratadas *in vivo* con insulina (I). Se observa que el peso ovárico es idéntico en ambos grupos, no se encontraron diferencias significativas en el número de células luteales por ovario, en la cantidad de proteína por ovario o en el contenido de ADN por célula luteal. Sin embargo, la cantidad de proteína por célula luteal fue significativamente mayor en ovarios obtenidos de ratas tratadas *in vivo* con insulina. Otro parámetro estudiado fue la concentración de progesterona (P) en circulación. Se observa que las ratas del grupo I presentan niveles significativamente más altos de P sérica que las controles (Tabla 3).

Para estudiar la regulación por insulina de la esteroidogénesis en este modelo experimental, se incubaron las células luteales aisladas de los grupos C e I en medio de cultivo durante 3 hs a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación constante. Luego de este tiempo, se separaron las células y en los medios de incubación se determinaron los niveles basales de P y 20-OH-P liberadas, usando radioinmunoensayos específicos. El tratamiento *in vivo* con insulina produjo una disminución significativa de la acumulación de P, acompañada de un aumento en su metabolización, ya que los niveles de 20-OH-P en células del grupo I son más elevados que los valores controles (Fig. 39, izquierda). Además, la producción de progestágenos, definidos como la suma de P + 20-OH-P, fue significativamente mayor en el grupo I (Fig. 39, derecha).

Parámetro	Grupo experimental	
	CONTROL	INSULINA
Peso ovárico (mg)	85 ± 4	87 ± 4
Nº de células/ovario x 10 <sup>-6</sup>	1,22 ± 0,14	1,49 ± 0,29
Cantidad de proteína/ovario (mg)	3,73 ± 0,06	3,36 ± 0,11
Cantidad de proteína/célula (ng)	0,51 ± 0,02	0,82 ± 0,09*
Contenido de ADN/célula (pg)	4,37 ± 0,14	4,03 ± 0,14
Progesterona sérica (ng/ml)	55 ± 10	134 ± 31*

**Tabla 3.** Comparación de algunos parámetros ováricos en ratas control y tratadas *in vivo* con insulina. Las células luteales aisladas fueron contadas en un hemocitómetro. Las proteínas se midieron por el método de **Lowry et al** [236]. El ADN se determinó fluorimétricamente. Al momento del sacrificio se recogió sangre troncal para el dosaje de P sérica por radioinmunoensayo, luego de dos extracciones del suero con éter etílico. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

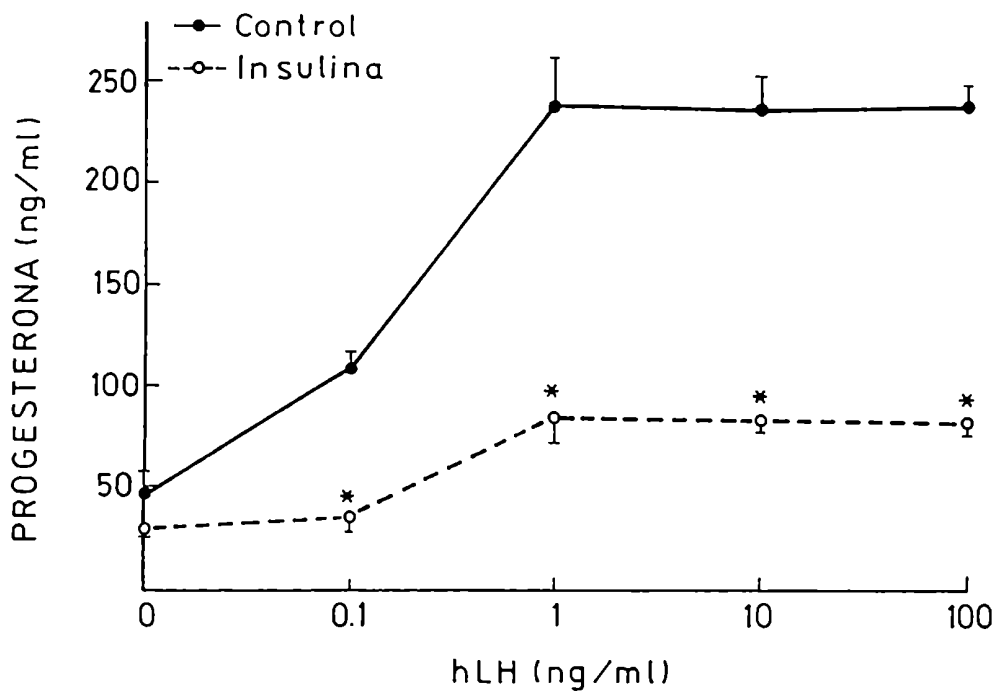




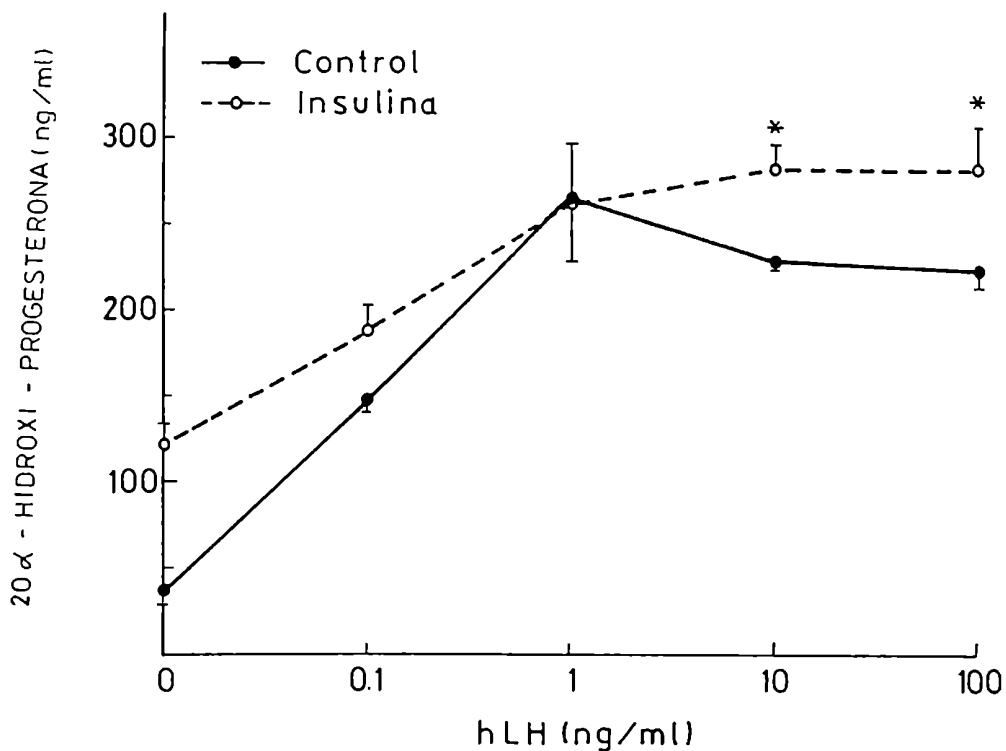
**Figura 39.** Producción de progestágenos de células luteales obtenidas de ratas control (C) o tratadas *in vivo* con insulina (I). Las células fueron incubadas en DMEM-HEPES con BSA 0,5% durante 3 hs a 37°C, con agitación. La progesterona y la 20-OH-P producidas se dosaron directamente de los medios de incubación por medio de radioinmunoensayos específicos. Izquierda: Niveles de P y 20-OH-P en los medios de incubación. Derecha: Acumulación de progestágenos, definidos como la suma de P + 20-OH-P en los medios de incubación. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) respecto a los controles.

Resultaba interesante, entonces, conocer cuál era la respuesta de las células luteales provenientes de animales del grupo I frente al estímulo de la LH, hormona trófica por excelencia del cuerpo lúteo. Para ello, se incubaron células de los grupos C e I durante 3 hs a 37°C en medio de cultivo con el agregado de hLH en concentraciones crecientes (0,01-100 ng/ml). En la Figura 40 se muestra la acumulación de P en estas condiciones; se observa que las células luteales provenientes de ratas del grupo I presentan niveles de P significativamente menores que las del grupo C, en todo el rango de concentraciones de la gonadotropina. En la Figura 41 se observan los niveles de 20-OH-P en las mismas condiciones. Las células del grupo I produjeron una mayor acumulación de 20-OH-P que las células controles. Sin embargo, la respuesta máxima a la LH fue menor en células provenientes de ratas tratadas *in vivo* con insulina, tanto para la acumulación de P como de 20-OH-P (P: 5 veces vs 2,7 veces de estimulación para los grupos C e I, respectivamente; 20-OH-P: 6,3 vs 2,3 veces de estimulación para los grupos C e I, respectivamente).

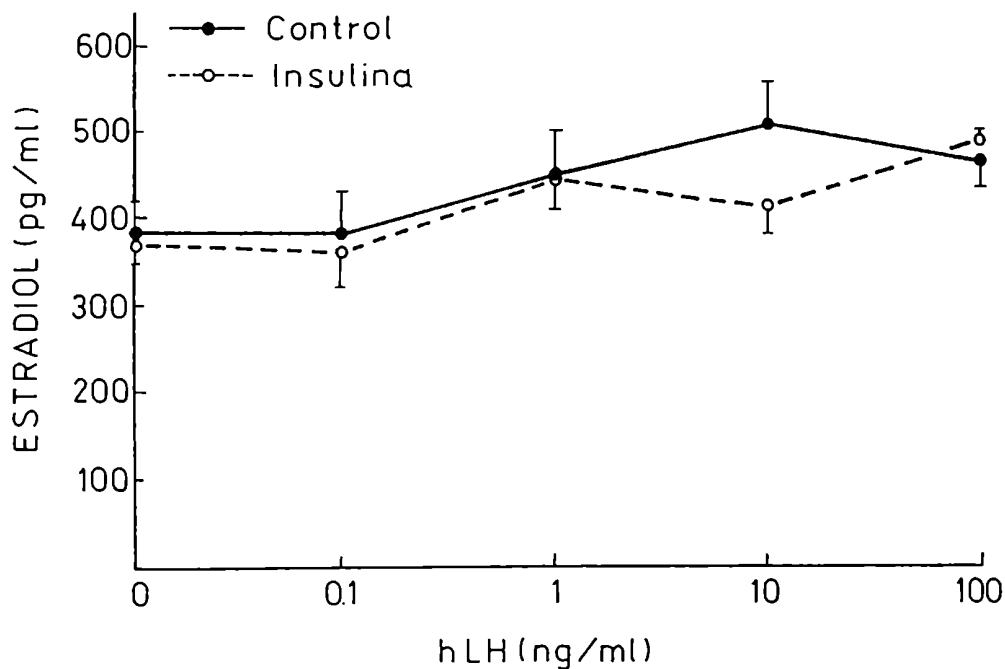
Una de las enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides que es modulada por distintos estímulos hormonales es la aromatasas, que convierte andrógenos en estrógenos. Para estudiar su regulación por insulina *in vivo*, se realizaron incubaciones de células luteales de los grupos C e I en presencia de androstenodiona como sustrato aromatizable y se determinaron los niveles de estradiol (Fig. 42). La producción de estradiol en ausencia de androstenodiona resultó no detectable. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, ni en los valores basales de estradiol, ni en la respuesta a la LH. Por lo tanto, la insulina en estas condiciones experimentales no modifica la actividad de la aromatasas.



**Figura 40.** Efecto de la hLH sobre la acumulación de progesterona en células luteales provenientes de ratas control o tratadas *in vivo* con insulina. Las células fueron incubadas en DMEM-HEPES con BSA 0,5% durante 3 hs a 37°C, con agitación, en presencia de concentraciones crecientes de hLH. La progesterona producida se dosó directamente de los medios de incubación por medio de un radioinmunoensayo específico. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a los respectivos controles.



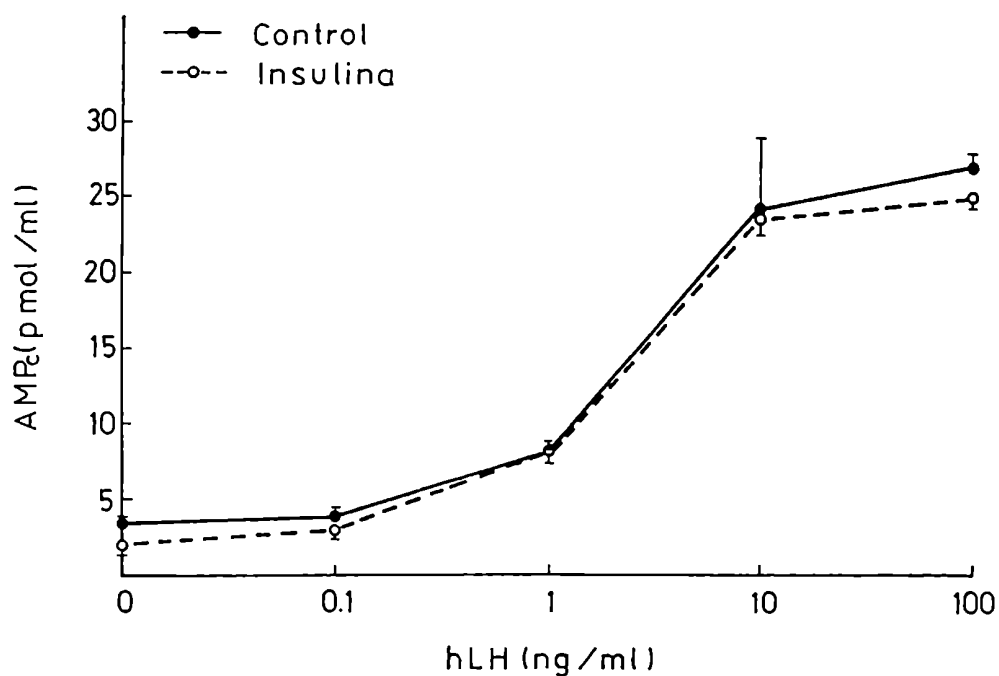
**Figura 41.** Efecto de la hLH sobre la producción de 20-OH-P por células luteales provenientes de ratas control o tratadas *in vivo* con insulina. Las células fueron incubadas en DMEM-HEPES con BSA 0,5% durante 3 hs a 37°C, con agitación, en presencia de concentraciones crecientes de hLH. La 20-OH-P producida se dosó directamente de los medios de incubación por medio de un radioinmunoensayo específico. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a los respectivos controles.



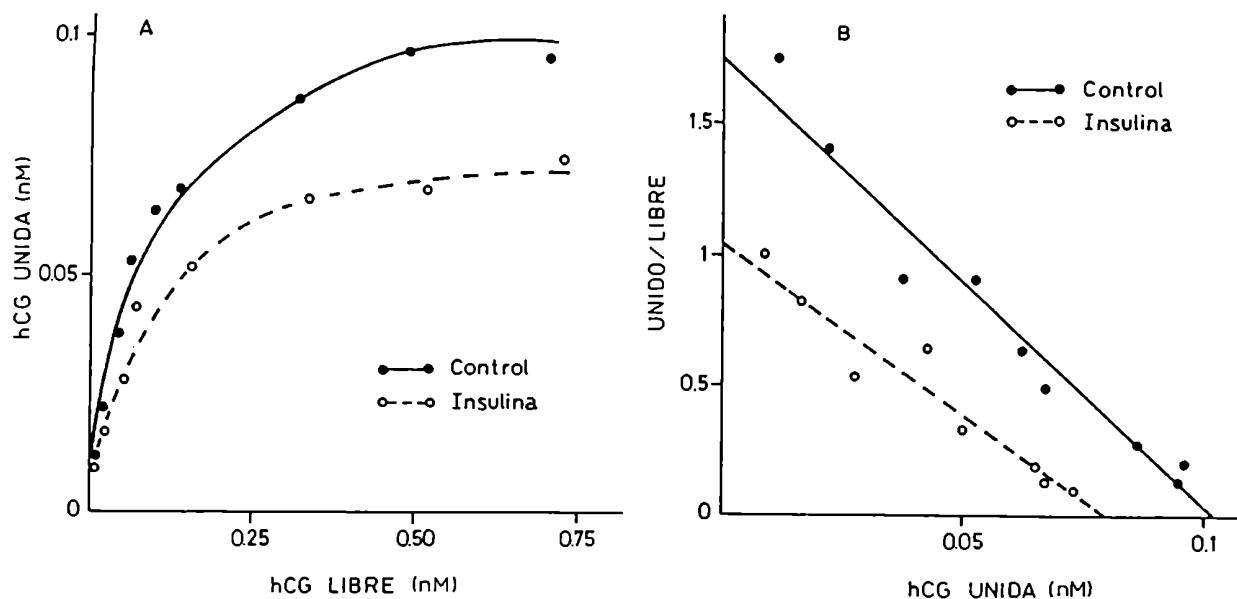
**Figura 42.** Producción de estradiol de células luteales provenientes de ratas control o tratadas *in vivo* con insulina. Las células fueron incubadas en DMEM-HEPES con BSA 0,5% durante 3 hs a 37°C, con agitación, en presencia de concentraciones crecientes de hLH y con androstenodiona 0,25  $\mu$ M. El estradiol producido se dosó directamente de los medios de incubación por medio de un radioinmunoensayo específico.

Con el objeto de averiguar si las diferencias en los niveles de progestágenos en células luteales de ambos grupos experimentales se debían a diferencias en los niveles de AMPc, se dosó el contenido de este nucleótido cíclico en los medios de incubación, en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa, el MIX. La Figura 43 muestra que las curvas dosis-respuesta a la LH para el AMPc son semejantes en C y en I. Esto sugiere que el efecto de la insulina se ejerce en una instancia posterior a la formación de AMPc, probablemente estimulando una o más enzimas esteroideogénicas.

Una posible explicación a la menor respuesta a la LH observada en la producción de progestágenos de células luteales del grupo I era que existieran cambios en los receptores de LH/hCG en este grupo. Para evaluar esta posibilidad, se estudió la unión de  $^{125}\text{I}$ -hCG a células luteales provenientes de ambos grupos de ratas. Para conocer los parámetros de la unión de la LH a su receptor, las células luteales (40.000 células en 0,25 ml) fueron incubadas con cantidades crecientes de  $^{125}\text{I}$ -hCG durante 3 hs a 37°C. En la Figura 44, panel A, se muestran las curvas de saturación (hCG unida vs. hCG libre) para células provenientes de los grupos C e I. En el panel B se muestra el gráfico de Scatchard correspondiente. Se observa la presencia de un único tipo de sitios receptores de alta afinidad para hCG. En el grupo control, la constante de disociación (Kd) fue  $0,059 \pm 0,007$  nM, mientras que el número de sitios (Q) fue  $388.834 \pm 14.146$  sitios/célula. La Kd no resultó modificada en células provenientes de ratas del grupo I, pero el número de sitios de unión se redujo significativamente (Kd:  $0,076 \pm 0,016$  nM, Q:  $303.057 \pm 13.392$  sitios/célula,  $p < 0,001$ ).



**Figura 43.** Efecto de concentraciones crecientes de hLH sobre los niveles de AMPc liberado por células luteales provenientes de ratas controles o tratadas *in vivo* con insulina. Las células se incubaron en DMEM-HEPES con BSA 0,5% durante 3 hs a 37°C, con agitación, en presencia de metil, isobutil xantina (0,1 mM). Luego de calentar 5 min a 100°C, los sobrenadantes se congelaron a -20°C hasta la determinación del nucleótido cíclico por RIA.

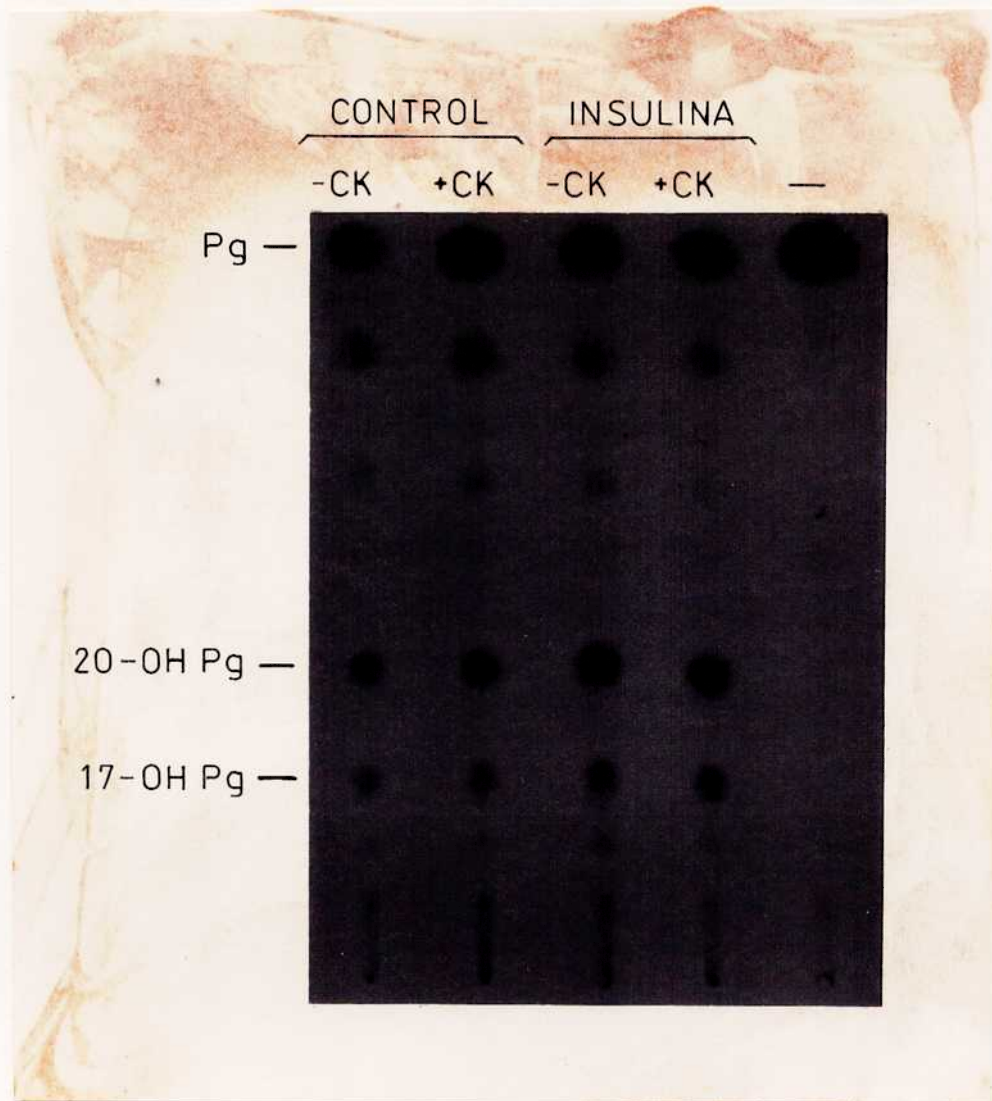


**Figura 44.** *A*, Curva de saturación de la unión de  $^{125}\text{I}$ -hCG a células luteales de ratas controles o tratadas con insulina. Alícuotas de las suspensiones celulares, conteniendo 40.000 células luteales en 0,25 ml de DMEM-HEPES con BSA 0,5% fueron incubadas 3 hs a  $37^\circ\text{C}$  con concentraciones crecientes de  $^{125}\text{I}$ -hCG ( $6 \times 10^{-11}$  -  $3 \times 10^{-9}$  M). *B*, Gráfico de Scatchard (hCG unida/libre vs hCG unida) de los mismos datos, mostrando que el tratamiento con insulina produjo una regulación negativa de un único tipo de sitios de LH/hCG de alta afinidad.

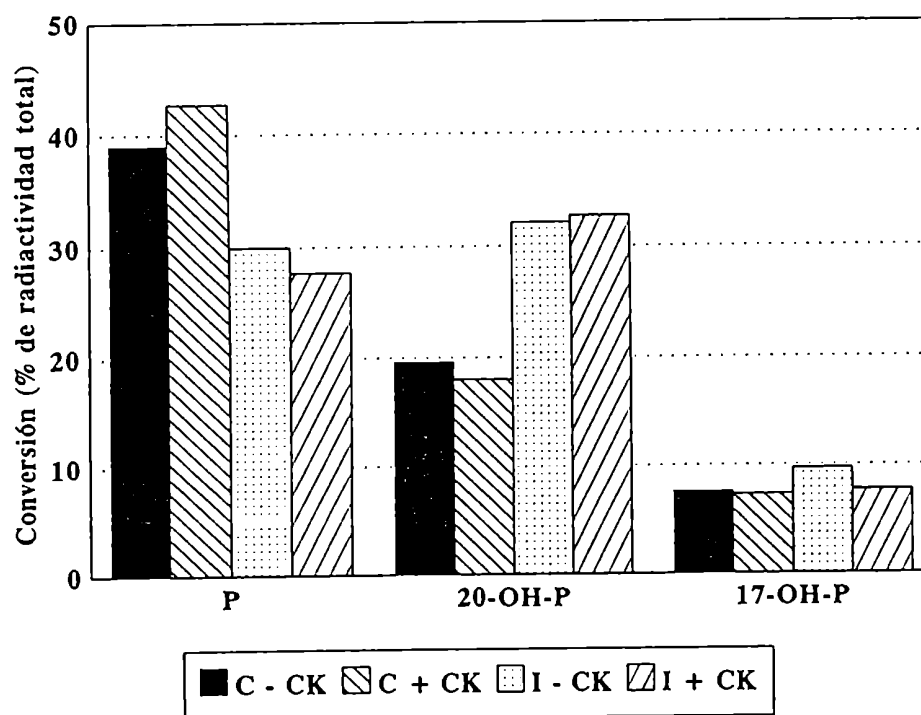


Las diferencias en los niveles de P y 20-OH-P por acción de la insulina *in vivo* indicaban una alteración en el metabolismo de esteroides en células luteales obtenidas de ratas del grupo I. Por lo tanto, se quiso investigar si existían otras diferencias en alguna de las rutas metabólicas de la P, es decir, en el contenido de otros progestágenos, de andrógenos o de estrógenos. Para ello, se incubaron células luteales provenientes de ratas controles y de ratas tratadas *in vivo* con insulina en DMEM-HEPES conteniendo 0,5% de BSA con 300.000 cpm de [1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)] progesterona durante 3 hs a 37°C en presencia o ausencia de cianocetona (CK; 10<sup>-5</sup> M), como inhibidor de la síntesis endógena de P. Al finalizar la incubación, se separaron las células por centrifugación y los sobrenadantes fueron sometidos a una cromatografía en capa delgada y posterior autorradiografía. La Figura 45 muestra los resultados obtenidos: los esteroides más abundantes, y los únicos que se pudo identificar por comparación con patrones, son P, 20-OH-P y 17-hidroxi-progesterona (17-OH-P). No se detectaron testosterona, androstenodiona, estradiol o DHT. En la Figura 46 se detalla la cuantificación de las bandas señaladas, luego de eluirlas de la placa y contar la radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido. Se observa que, tanto en presencia como en ausencia de CK, las células luteales del grupo I producen menos P y más 20-OH-P que las C, en concordancia con los resultados anteriores, mientras que no parece haber diferencias significativas en la producción de 17-OH-P entre los grupos C e I. Por lo tanto, en células luteales provenientes de ratas tratadas *in vivo* con insulina, la única modificación en el metabolismo de la progesterona que fue posible detectar por este método es su conversión a 20-OH-P, su principal metabolito en ovario de rata.

Como ya fue mencionado, el paso limitante en la esteroidogénesis es la conversión de colesterol a pregnenolona. Esta reacción está catalizada por un



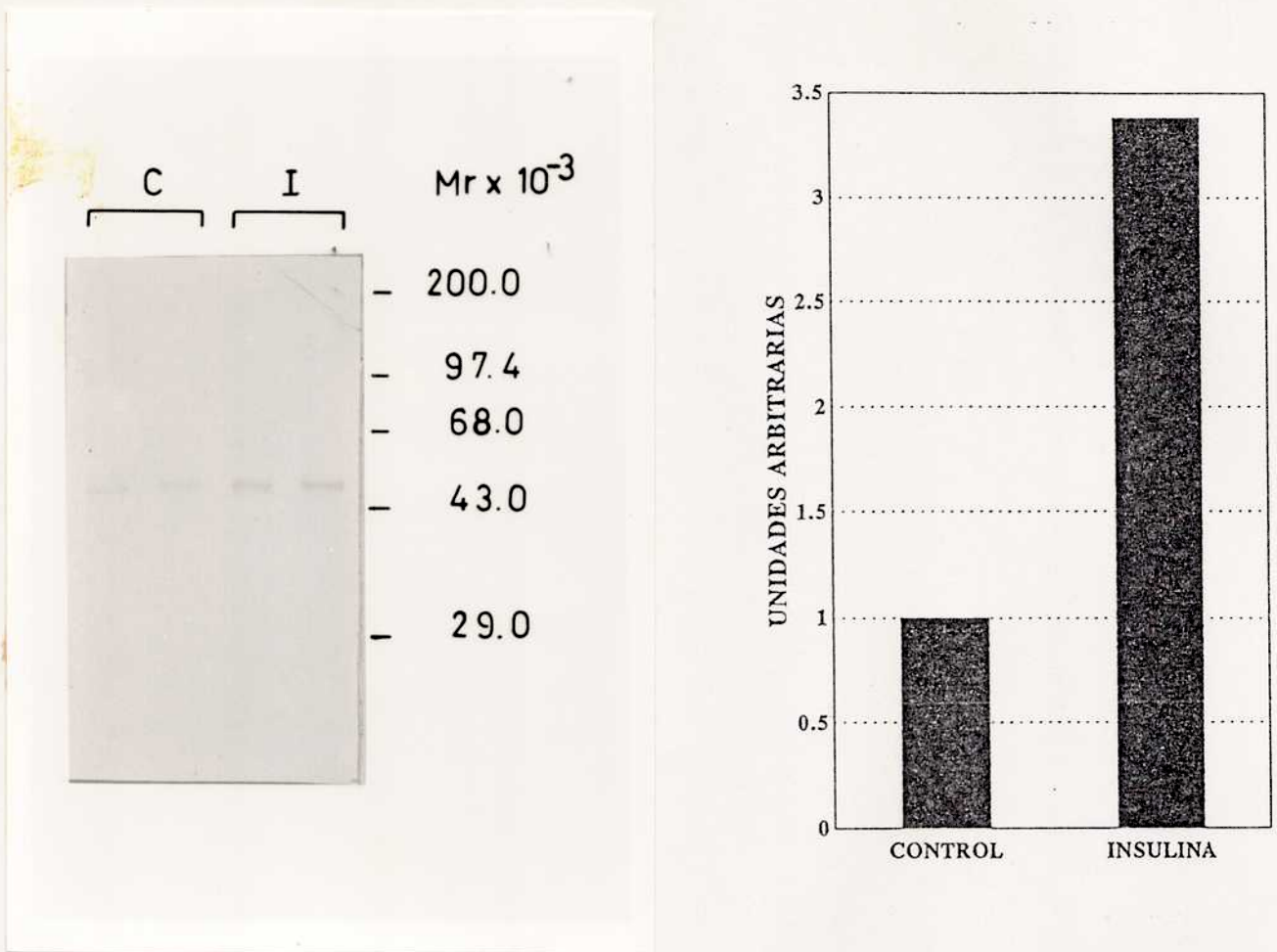
**Figura 45.** Autorradiografía de la placa de sílica gel en la que se realizó una cromatografía en capa delgada de sobrenadantes de células luteales de los grupos control e insulina incubados en DMEM-HEPES con BSA 0,5% con 300.000 cpm de [1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)] progesterona durante 3 hs a 37°C en presencia o ausencia de cianocetona (CK; 10<sup>-5</sup> M). En la última calle (-) se corrió un medio sin células previamente incubado por 3 hs con la progesterona tritiada. Por comparación con estándares, se indica la posición en que corrieron la progesterona (Pg), 20-OH-P (20-OH Pg) y 17-OH-P (17-OH Pg).



**Figura 46.** Efecto del tratamiento insulínico *in vivo* sobre el metabolismo de la progesterona en células luteales de rata. Se procedió como se explica en la Figura anterior y las zonas de la placa de sílica que contenían radiactividad, según la observación de la autorradiografía correspondiente, fueron recortadas y contadas en un contador de centelleo. Se grafica conversión del sustrato en los distintos intermediarios o productos, como % de la radiactividad total en cada calle.

complejo enzimático mitocondrial, que contiene al citocromo P450<sub>SCC</sub>. El hecho de que las células luteales provenientes de ratas tratadas *in vivo* con insulina produjeran más progestágenos que las células provenientes de animales controles indicaba la posibilidad de que la insulina estuviera regulando la actividad de la SCC. Por tratarse de un tratamiento prolongado, parecía más probable que la acción de la hormona involucrara cambios en la cantidad de alguna de las proteínas que forman el complejo enzimático.

Por lo tanto, se estudió la regulación que podría ejercer la insulina *in vivo* sobre el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub>. Para ello, se aislaron fracciones mitocondriales de células luteales y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 10% con SDS e inmunoblot con un anticuerpo policlonal anti-citocromo P450<sub>SCC</sub>. Se observó un aumento del contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub> inmunorreactivo en fracciones mitocondriales de células luteales provenientes de ratas tratadas *in vivo* con insulina (Fig. 47). Estos resultados demuestran que la insulina *in vivo* produce un incremento de la producción de progestágenos en células luteales a través de un aumento del contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub>.



**Figura 47.** Efecto del tratamiento *in vivo* con insulina sobre el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub> en células luteales. *Izquierda:* Se sometieron fracciones mitocondriales de células luteales de los grupos C e I a electroforesis en gel de poliacrilamida 10% con SDS y Western blot con un anticuerpo anti-citocromo P450<sub>SCC</sub>. *Derecha:* El inmunoblot obtenido fue cuantificado por densitometría laser. Los datos de densidad óptica leídos se expresan como unidades relativas al valor de la primera calle, que se toma como 1.

## ***DISCUSSION***

## **Capítulo 1: Efecto de la diabetes por estreptozotocina sobre la actividad de fosfodiesterasa en células luteales**

En un trabajo previo de nuestro laboratorio, Téllez-Iñón *et al.* caracterizaron la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE) de células luteales de rata [391]. Se encontraron dos formas enzimáticas citosólicas de PDE de alta afinidad por el AMPc, que responden a la insulina *in vitro* con un aumento de su actividad. Ambas degradan AMPc, pero solamente una de ellas hidroliza también GMPc. Además, los dos picos de actividad son estimulables en presencia del complejo  $Ca^{++}$ -calmodulina [391].

En el presente trabajo, se caracterizó a la PDE presente en células luteales obtenidas de ratas diabéticas por estreptozotocina. La mayor parte de la actividad se encontró en citosol en los tres grupos experimentales, sugiriendo la presencia de las mismas formas enzimáticas en estas células que las encontradas en células de ratas controles. Heyworth *et al.* [159] describieron que la actividad de PDE estimulable por insulina en hepatocitos se encuentra en la fracción particulada, pero que está débilmente unida a la membrana plasmática y por lo tanto puede extraerse fácilmente con un buffer hipotónico, como el utilizado en este trabajo. Es probable que la enzima de cuerpo lúteo presente la misma localización.

Se encontró un aumento significativo de la actividad específica de la PDE en células luteales provenientes de animales diabéticos. Este resultado concuerda con el reporte de Makino *et al.* [240], que describe un aumento de la actividad de PDE en adipocitos de ratas diabéticas por estreptozotocina. En cambio, Senft *et al.* [358] describieron una inhibición de la actividad de PDE en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético de ratas diabéticas por aloxano, que pudo ser revertida por

inyección de insulina. Solomon [371] también reportó una disminución de la actividad de PDE en adipocitos de ratas diabéticas por estreptozotocina. Estas discrepancias pueden deberse al empleo de distintas preparaciones enzimáticas y condiciones experimentales. Además, los tejidos utilizados en estos estudios, efectores de las acciones clásicas de la insulina, pueden comportarse de manera diferente que el cuerpo lúteo, en el que la hormona actúa en forma trófica, estimulando la esteroidogénesis.

El incremento de la actividad de PDE obtenido en células luteales de ratas diabéticas no pudo ser revertido con la terapia sustitutiva insulínica. Sin embargo, este tratamiento *in vivo* con la hormona restablece otros parámetros ováricos. En efecto, en trabajos previos de nuestro laboratorio en ratas diabéticas por estreptozotocina, se describió una disminución del número de sitios receptores de LH en ovario y una menor sensibilidad de las células luteales a la hCG *in vitro* medida como producción de progesterona. Ambos parámetros se revirtieron en células luteales obtenidas de ratas tratadas con insulina [389]. En cambio, la producción de AMPc en respuesta a la hCG fue mayor en células luteales obtenidas de ratas diabéticas, lo que sugiere que la actividad de adenilato ciclasa está aumentada en estas células. En este caso, los valores no se restablecieron con el tratamiento *in vivo* con insulina.

Resulta interesante que los dos parámetros cuyos valores no pudieron revertirse por administración de insulina están relacionados con la regulación de los niveles celulares de los nucleótidos cíclicos. Es posible que la deficiencia insulínica en los animales diabéticos cause una modificación irreversible en las enzimas relacionadas con la formación, degradación y función del AMPc, como la adenilato ciclasa, la PDE o la proteína quinasa dependiente de AMPc.



Por otra parte, la estimulación por insulina *in vitro* de la PDE en células luteales de ratas diabéticas fue mayor que en células del grupo C. Sin embargo, como la incubación con insulina se realizó con una única concentración de la hormona (2 nM) existe la posibilidad de que esta observación sea consecuencia de una distinta sensibilidad a la insulina de la PDE presente en ratas diabéticas. En efecto, Makino *et al.* [240] describieron un aumento de la sensibilidad a la hormona en adipocitos de ratas diabéticas por estreptozotocina, aunque el efecto máximo de la insulina fue mayor en células obtenidas de ratas controles. Por el contrario, Solomon [371] encontró que la sensibilidad a la insulina de la PDE de ratas diabéticas era igual a la de ratas controles, pero la máxima activación de la enzima era mayor en animales diabéticos.

En ratas diabéticas, se ha descrito un aumento en el número de receptores de insulina [208]. Esto podría explicar la mayor activación de la PDE por insulina *in vitro* en células luteales del grupo D. Sin embargo, en ratones hiperglucémicos obesos (ob/ob), el número de receptores de insulina está disminuido, mientras que la sensibilidad de la PDE a la insulina está incrementada [241]. Por lo tanto, la alteración de la sensibilidad de la PDE a la hormona no se puede explicar solamente por un cambio en los receptores de insulina.

La purificación parcial de la PDE a través de una cromatografía de intercambio iónico permitió identificar dos picos de actividad enzimática en los tres grupos experimentales. Además, la PDE en ambos picos respondió al complejo  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina con un aumento de su actividad, aunque la estimulación resultó mayor en el extracto control. Téllez-Iñón *et al.* mencionan que no se puede descartar que la aparente activación de una misma fracción de PDE tanto por insulina como por  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina represente en realidad dos formas enzimáticas que no se resuelven con el

método de purificación empleado. Si así fuera, la menor estimulación por  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina observada en células luteales de los grupos D e Ins podría deberse a una menor proporción de la PDE sensible a  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina en estas células respecto de las células controles.

La determinación de los parámetros cinéticos de la PDE en los grupos C, D e Ins indicó la existencia de dos sitios aparentes de hidrólisis de AMPc, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. Mientras que no se encontró diferencia en la afinidad de la enzima por el AMPc en los tres grupos, la velocidad máxima de la forma de baja afinidad resultó mayor en el grupo diabético, observándose una reversión parcial en el grupo Ins. Makino *et al.* [208] también describieron un aumento de la velocidad máxima de la PDE en adipocitos aislados de ratas diabéticas, sin ningún cambio en el Km. Sin embargo, en ese trabajo se caracterizó solamente la forma de alta afinidad, ya que se utilizaron concentraciones de sustrato menores de 1  $\mu\text{M}$ . En el trabajo de Solomon se reportó en ratas diabéticas una disminución de la Vmax de la forma de alta afinidad, sin alteraciones en la Vmax de la forma de baja afinidad ni en los Km [371]. En nuestro sistema, no se encontraron diferencias en la Vmax de la forma de alta afinidad entre los distintos grupos experimentales.

En distintos tipos celulares, incluyendo las células de granulosa de rata, ha sido demostrada la inducción por sustrato de las fosfodiesterasas [28,71,76,242,355]. Sin embargo, en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en los niveles endógenos de AMPc de cuerpos lúteos de los grupos C, D e Ins. Sin embargo, no se puede descartar que haya cambios en los pools celulares endógenos de AMPc no detectables por la técnica utilizada. Con estos resultados se concluye que el aumento de la actividad catalítica de la PDE en ratas diabéticas se debería a una modificación de la enzima y no a una variación de los niveles de AMPc.

## **Capítulo 2: Acción de la insulina in vitro sobre células luteales**

### **2.1. Efecto de un sistema generador de NADPH sobre células luteales.**

#### **Modulación por LH e insulina**

En numerosos trabajos se ha demostrado que el NADPH es un cofactor esencial en la biosíntesis gonadal de hormonas esteroideas [144,285]. Las deshidrogenasas del ciclo del ácido cítrico y de la vía de las pentosas son las principales generadoras de este cofactor en las gónadas. En la mitocondria existe un sistema de transferencia de electrones específico para esteroides, paralelo a la cadena respiratoria, involucrado en reacciones de hidroxilación y en la ruptura de la cadena lateral del colesterol. Mientras que la cadena de transporte de electrones respiratoria es específica para NADH, el principal dador de electrones para la cadena esteroideogénica es el NADPH [332].

Esta cadena de transporte de electrones ha sido resuelta en tres componentes: un citocromo P450, que es la oxigenasa terminal (aceptor de electrones), una flavoproteína que contiene FAD y una proteína que contiene hierro y azufre, llamada luteodoxina o adrenodoxina, que transporta electrones entre los otros dos componentes [377]. Este complejo enzimático, llamado SCC, es responsable de catalizar el paso limitante de la esteroideogénesis, que es la conversión de colesterol a pregnenolona. Por otra parte, el NADPH actúa como cofactor específico en por lo menos seis pasos enzimáticos individuales en el camino biosintético de acetato a colesterol y a progesterona [248]. Por lo tanto, bajos niveles de NADPH resultarían en una producción de esteroides disminuida.

En nuestro laboratorio se han caracterizado receptores específicos de insulina en células luteales de rata y se ha descrito un efecto estimulador de la hormona sobre la esteroidogénesis en estas células [216]. Sin embargo, la estimulación *in vitro* por insulina de los niveles de progesterona, al igual que por LH, es sólo de dos veces (100%). Estas células producen niveles basales de progesterona altos, debido a la previa estimulación *in vivo* con gonadotrofinas utilizada para obtener un estado de pseudopreñez rico en cuerpos lúteos. Una posible explicación a esta sensibilidad moderada de las células es que su maquinaria biosintética esté agotada y no logre responder a un nuevo estímulo *in vitro*. Otra posibilidad es que el grado de diferenciación de estas células requiera del aporte de NADPH exógeno como cofactor para la biosíntesis de esteroides. Con el objeto de explorar esta última hipótesis, se ensayó el efecto de un sistema generador de NADPH (SG) sobre la síntesis basal de progesterona y sobre los niveles de P en respuesta a insulina y LH.

Los resultados obtenidos extienden y confirman resultados previos que muestran que la adición de NADPH o de un sistema generador de NADPH estimula la síntesis de hormonas en preparaciones de tejidos esteroidogénicos, como adrenal y cuerpo lúteo bovinos y testículo de rata [42,67,140,346]. La estimulación de la acumulación de progesterona ejercida por el SG en nuestro sistema fue de entre 8 y 15 veces en distintos experimentos. La magnitud de este efecto es mayor que la de la acción de la insulina y la LH, ya sea en incubaciones cortas o en cultivo de células luteales [216,345].

El aumento de la producción de progesterona en presencia de NADPH exógeno confirmaría que el cofactor reducido es el responsable de la estimulación observada. Sin embargo, el efecto del NADPH resultó mucho menor que el del SG y limitado a un rango de concentraciones estrecho. Savard *et al.*, a partir de

observaciones similares en cortes de tejido de cuerpo lúteo bovino, sugieren que la estimulación involucraría la penetración de los componentes del SG al tejido luteal, donde ocurriría la reducción a NADPH [346]. Sin embargo, la ausencia de estimulación significativa si se omite alguno de los componentes del SG en el medio de incubación torna poco probable esta hipótesis en nuestro sistema, ya que el contenido endógeno del componente excluido debería ser suficiente para generar al menos un pequeño incremento de los niveles de progesterona. De hecho, esta situación fue descrita por Mason *et al.* en cuerpo lúteo bovino, donde en ausencia de la D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se obtuvieron niveles de progesterona mayores que en presencia del SG completo [248]. Los autores mencionan que los niveles endógenos de la enzima en tejido lúteo bovino son suficientemente altos como para reducir completamente al NADP<sup>+</sup> agregado.

La medición de los niveles de 20-OH-P en los medios de incubación de células luteales permitió comprobar que el aumento en la acumulación de progesterona inducido por el SG no era causado por una disminución de su metabolización. En forma similar, se observó que el efecto estimulador de la LH y el efecto inhibitorio de la insulina sobre esta acumulación no involucraban cambios en la actividad de la 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

El efecto de la insulina sobre la estimulación de la producción de progesterona por el SG fue totalmente opuesto al de la LH, lo que estaría reflejando los distintos mecanismos involucrados en la acción trófica de ambas hormonas en células luteales. La acción inhibitoria de la insulina sobre el aumento de los niveles de progesterona inducido por el SG podría deberse a una estimulación específica por insulina de la NADPH-oxidasa, lo cual traería como consecuencia una metabolización del cofactor [277]. Otra explicación es que la insulina activa la

síntesis de ácidos grasos, que utiliza NADPH como cofactor de las reductasas [380] y, por ello, reduciría los niveles de cofactor disponibles para la SCC. Esta ruta metabólica sería importante en cuerpo lúteo, ya que las células luteales almacenan gran cantidad de grasas dentro de gotas lipídicas citoplasmáticas.

Por su parte, la LH presenta un efecto estimulador y aditivo sobre la producción de progesterona en presencia del SG. Esto está reflejando que los sitios de acción de la gonadotropina y del NADPH son distintos. La LH activa la conversión de colesterol a pregnenolona a través de una activación de la colesterol esterasa, facilitando el transporte del colesterol a la mitocondria y de la pregnenolona hacia afuera de ella, regulando la internalización y el transporte de los receptores de lipoproteínas a los lisosomas o activando a la SCC [50,143,292,395]. El cofactor complementa este efecto estimulando la actividad de la SCC. Este resultado concuerda con las observaciones de Koritz *et al.*, que describieron un efecto aditivo del NADPH y la ACTH sobre la esteroidogénesis en la adrenal [211]. Sin embargo, Blankenstein *et al.* y Savard *et al.* no pudieron obtener resultados concluyentes acerca de un efecto aditivo del NADPH y la LH en células testiculares de rata y cuerpo lúteo bovino, respectivamente [42,346].

El 25-hidroxi-colesterol (CHO), que es más soluble que el colesterol y atraviesa las membranas celulares con más facilidad, es un excelente sustrato para la SCC [377]. Existía la posibilidad de que la respuesta de las células al SG estuviera limitada por agotamiento del sustrato esteroidogénico. Sin embargo, la presencia de CHO produjo un leve incremento de la acumulación de progesterona basal y estimulada por el SG, que no resultó significativo. La LH fue capaz de aumentar la respuesta máxima al SG, obtenida con  $\text{NADP}^+$  1 mM, cuando se agregó este sustrato exógeno al medio de incubación. Esto sugiere que, en las condiciones experimentales

utilizadas, las enzimas esteroideogénicas capaces de ser estimuladas por la LH, como la SCC, son el factor limitante en la biosíntesis de esteroides.

La adenosina amplifica marcadamente la respuesta de células luteales humanas y de rata a la LH. Su efecto es aumentar la acumulación máxima de AMPc en respuesta a la LH hasta 10 veces o más y disminuir el ED<sub>50</sub> de la LH para la producción de progesterona en igual medida. Además, la adenosina incrementa los valores basales de AMPc más de seis veces [373]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó la posibilidad de que el NADPH o el NADP<sup>+</sup> (estructuralmente relacionados con la adenosina) estuvieran actuando a nivel de la membrana plasmática uniéndose a los receptores de adenosina o se convirtieran en adenosina. Sin embargo, el SG no elevó los niveles basales de AMPc ni amplificó la acción de la LH sobre este nucleótido cíclico.

Los resultados obtenidos usando inhibidores específicos de la esteroideogénesis confirman que el sitio de acción del NADPH es a nivel de la ruptura de la cadena lateral del colesterol. Esta acción estimula la producción de pregnenolona, lo que generará un aumento en los niveles de progesterona.

La posibilidad de que el NADPH atraviese la membrana plasmática ha sido una cuestión controvertida. A partir de observaciones en adrenal bovina, Halkerston concluyó que la membrana celular era impermeable al cofactor [139]. Sin embargo, Blankenstein *et al.* comprobaron que tal aseveración no se aplicaba a células de Leydig, ya que luego de obtener una preparación de células intactas por gradiente de Ficoll obtenían mayor producción de testosterona que con preparaciones crudas [42].

Con el objeto de dilucidar este interrogante en nuestro sistema, se ensayó el efecto del SG sobre cultivos de células luteales previamente purificadas por gradiente de Percoll. El efecto estimulador del SG también se observó en este sistema, en el que la presencia de células dañadas durante la digestión con colagenasa está altamente reducida. Esto indicaría que la acción del NADPH está mediada por una libre entrada del cofactor a través de la membrana plasmática de la célula luteal, como fue postulado para células de Leydig [42].

En cuanto al objetivo esencial de esta parte del trabajo, si bien el SG fue capaz de aumentar la respuesta de las células a la insulina, esta respuesta fue menor que la producida por el SG solo, indicando un efecto inhibitorio de la hormona sobre la acción del NADPH. En cambio, el SG amplificó la respuesta a la LH, que pudo ser incrementada aún más en presencia de un sustrato esteroideogénico exógeno, como el CHO. De todas formas, la estimulación de la producción de progesterona por LH o insulina resultó menor en presencia del SG que en su ausencia. Esto sugiere que las células luteales tienen un techo en su capacidad de estimulación por LH e insulina, aun cuando los niveles basales de P pueden ser modificados en presencia de cofactores o sustratos de la esteroideogénesis.

## **2.2. Comparación de los efectos de la insulina y el IGF-I sobre la esteroideogénesis en células luteales**

En los últimos años ha aparecido una gran cantidad de trabajos acerca del efecto estimulador de diversos factores de crecimiento sobre la proliferación y diferenciación de células ováricas [131]. Además, se ha demostrado la presencia de varios de ellos en fluido folicular [356] así como la síntesis, tanto de los factores como de sus receptores específicos, en células ováricas de distintas especies [131].



Uno de estos factores es el IGF-I; recientemente, se ha demostrado que tanto el factor como su receptor se expresan en células luteales de rata y que el IGF-I tiene un efecto estimulador sobre la biosíntesis de P de células luteales en cultivo [303,385]. A partir de estos antecedentes y de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio acerca de la acción de la insulina sobre células luteales de rata, se quiso comparar el efecto del IGF-I con el de la insulina sobre células luteales en cultivo y en incubaciones cortas.

Los efectos de la insulina y del IGF-I sobre la producción de progestágenos en células luteales resultaron apreciablemente diferentes. El IGF-I presentó un efecto estimulador, fundamentalmente sobre la acumulación de progesterona solamente luego de 24 hs de cultivo y a una concentración de 100 ng/ml. En cambio, la insulina estimuló la acumulación de P y 20-OH-P desde una concentración de 0,1 ng/ml en cultivo y 10 ng/ml en incubaciones cortas. Estos valores están dentro del rango fisiológico de insulina en circulación.

El efecto estimulador del IGF-I sobre la acumulación de progesterona en células luteales parece requerir algún cambio metabólico o síntesis de nueva proteína a largo plazo, ya que en incubaciones de 3 horas el factor de crecimiento no produce cambios significativos ni en los niveles de P ni de 20-OH-P. Talavera *et al.* indican la necesidad de una estimulación prolongada (72 horas) con IGF-I para obtener una respuesta esteroideogénica en células luteales de rata en cultivo [385]. Las divergencias respecto del tiempo necesario para observar el efecto del IGF-I pueden deberse a diferencias en el método de cultivo empleado.

Cabe aclarar que el IGF-I parecería tener acción estimuladora sobre la metabolización de la progesterona. Puede observarse que tanto en incubación de 3

horas como en cultivo, el factor produjo un incremento de la acumulación de 20-OH-P. Aparentemente, la acción del IGF-I a tiempos cortos parece circunscribirse a la regulación de la metabolización de la progesterona y no de su síntesis. En contraste, a tiempos de estímulo más prolongados se observa un aumento neto de la síntesis de progesterona.

La necesidad de una concentración tan elevada de IGF-I (100 ng/ml) para obtener respuesta esteroideogénica, comparada con los niveles fisiológicos de IGF-I (1-10 ng/ml), podría indicar que el IGF-I a altas concentraciones se uniría a los receptores de insulina, por los que tiene moderada afinidad, en una proporción suficiente como para provocar una respuesta esteroideogénica, o bien que el factor esté actuando a través de sus propios receptores, pero que en este sistema la velocidad de degradación del IGF-I sea importante.

En el caso de la insulina, por el contrario, se puede asegurar que está interactuando a través de sus propios receptores, ya que la hormona estimula la acumulación de progestágenos a concentraciones tan bajas como 0,1 ng/ml. Teniendo en cuenta la moderada afinidad que presenta la insulina por el receptor de IGF de tipo I, estos niveles de insulina son incapaces de provocar una respuesta mediada por este receptor.

A partir de estos resultados se puede concluir que la insulina es un modulador importante y fisiológico de la esteroideogénesis en células luteales y que el IGF-I no sería un regulador de la biosíntesis de esteroides en cuerpo lúteo de rata. Por el contrario, en células de granulosa de distintas especies, el IGF-I tiene una acción marcadamente estimuladora de la proliferación y de la esteroideogénesis [132], mientras que se postula que la acción estimuladora de la insulina en estas células

estaría mediada por los receptores de IGF de tipo I [7]. Esta diferencia de sensibilidad a la insulina entre las células de granulosa y luteales se relaciona probablemente con la distinta irrigación de ambos tipos celulares. Las células de granulosa del folículo ovárico no están irrigadas, pero después de la ovulación se produce un aumento importante de la vascularización, permitiendo el acceso de la insulina circulante al cuerpo lúteo.

### **2.3. Efecto de la insulina sobre el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub> en células luteales en cultivo**

La conversión de colesterol a pregnenolona es el paso limitante de la velocidad de la esteroidogénesis. Esta reacción está catalizada por el sistema enzimático mitocondrial de ruptura de la cadena lateral del colesterol (SCC), compuesto por el citocromo P450<sub>SCC</sub>, la adrenodoxina y la adrenodoxina reductasa [365]. La ACTH en la adrenal y las gonadotrofinas en las gónadas activan la esteroidogénesis a través de un aumento en el contenido de estas proteínas y de sus respectivos ARNm, por un mecanismo dependiente de AMPc [148].

En el ovario de rata, numerosos estudios en folículos enteros, células de granulosa, tecales y cuerpo lúteo han indicado que el complejo enzimático SCC está sujeto a regulación hormonal. En células de granulosa, la FSH produjo un aumento del contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub>, adrenodoxina y adrenodoxina reductasa y de sus respectivos ARNm [396]. En células tecales-intersticiales, Magoffin *et al.* reportaron que tanto la LH como el IGF-I aumentaron el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub> (proteína y ARNm) [239]. Goldring *et al.* describieron que mientras que el ARNm del citocromo P450<sub>SCC</sub> está regulado por estradiol y FSH en células de granulosa de folículos preovulatorios y por LH en células tecales de estos mismos

folículos, este ARNm parecía tener una expresión constitutiva en cuerpo lúteo [136]. Los autores sugieren que este cambio en la regulación de la expresión del P450<sub>SCC</sub> sería inducido rápidamente por el pico de LH/hCG.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, a través de un inmunoblot, indican que la insulina, a una concentración de 10 ng/ml, aumenta el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub> en células luteales luego de 24 hs de cultivo. Este podría ser uno de los mecanismos por los cuales la insulina estimula la esteroidogénesis *in vitro*. Este es el primer reporte de un efecto de la insulina sobre el P450<sub>SCC</sub> en cuerpo lúteo e indicaría que, por lo menos a nivel de cantidad de proteína, el P450<sub>SCC</sub> está sujeto a regulación hormonal. Sin embargo, por medio de la inmunoprecipitación del P450<sub>SCC</sub> marcado con <sup>35</sup>S-metionina, no se encontraron cambios en la síntesis *de novo* del P450<sub>SCC</sub> en presencia de insulina, aun luego de tres días de cultivo. Esto sugiere que el efecto estimulador de la hormona no ocurriría a través de un aumento en la síntesis de la proteína, sino por una disminución de su degradación. Sin embargo, no se puede descartar que el diseño experimental utilizado no sea el más adecuado para poner en evidencia pequeños cambios en la síntesis de la enzima. Serán necesarios nuevos experimentos para dilucidar estas hipótesis.

### **Capítulo 3: Efecto in vivo de la insulina sobre células luteales**

Así como la deficiencia insulínica (diabetes mellitus tipo I) se asocia con hipofunción ovárica [39], el exceso de insulina (en cualquiera de los diversos estados de resistencia insulínica) se asocia con hiperestimulación ovárica, usualmente manifestada como hiperandrogenismo [34,386]. Aun cuando esta estrecha correlación entre resistencia insulínica e hiperandrogenismo está bien establecida, no está claro cuál de estas dos anomalías es el evento primario. Algunos autores postulan que la

hiperinsulinemia causada por la resistencia insulínica produce hiperandrogenismo [34,386], mientras que otros sugieren lo contrario [361].

Una de los interrogantes que se plantean es por qué la hiperestimulación ovárica se manifiesta principalmente como hiperandrogenismo, teniendo en cuenta que la insulina estimula la síntesis ovárica no sólo de andrógenos, sino también de estrógenos y progestágenos [316,347,409]. Aunque no se ha hallado la respuesta a esta pregunta, se sugiere que la hiperestimulación ovárica causa hiperandrogenismo porque la insulina actúa en forma sinérgica con la LH, posiblemente regulando positivamente los receptores de la gonadotropina, para estimular la producción de andrógenos en las células de la teca [314]. Sin embargo, no se sabe si en estados hiperinsulinémicos el ovario luteinizado presenta alteraciones en su producción y/o secreción de esteroides.

Por otra parte, mientras que la acción *in vitro* de la insulina y del IGF-I sobre la esteroidogénesis ha sido exhaustivamente estudiada en células de granulosa [7,9,79] y luteales [216,303,345,385] de rata, no ha habido reportes acerca de los efectos de la administración de insulina *in vivo* sobre la esteroidogénesis en células ováricas. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se generó un estado de hiperinsulinemia en ratas prepúberes superovuladas y se evaluó la producción de progestágenos, andrógenos y estrógenos en células luteales, la posible modulación de los receptores de LH y la respuesta de las células a la gonadotropina.

Los resultados indican que el tratamiento con insulina aumenta la actividad esteroidogénica de ovarios luteinizados. Esta acción de la insulina se refleja en un incremento de los niveles circulantes de progesterona y en un aumento de la

producción de progestágenos en células luteales obtenidas de ratas tratadas con insulina.

La determinación de algunos parámetros ováricos sólo reveló diferencias significativas entre los grupos C e I en el contenido de proteína por célula luteal y en los niveles de progesterona sérica. Entre las acciones metabólicas de la insulina está ampliamente demostrado su efecto estimulador de la síntesis proteica [319]. En este caso, el efecto parecería ser específico sobre las células luteales y no sobre otros tipos celulares minoritarios del ovario luteinizado.

Los niveles séricos de progesterona resultaron más elevados en ratas tratadas con insulina. Esta observación indicaría que las células luteales de ratas del grupo I producen y secretan más P que las células del grupo C. Sin embargo, cuando se midió la acumulación de progesterona *in vitro*, los valores resultaron más bajos en células del grupo I, aunque la suma de P y 20-OH-P fue mayor. Es probable que esta discrepancia se deba a las diferencias entre el sistema *in vivo* e *in vitro*. La metabolización de la progesterona podría estar aumentada en incubaciones *in vitro*, mientras que la P producida *in vivo* sería rápidamente liberada a la circulación, escapando así a la conversión a su metabolito inactivo. Por otra parte, este aumento de los niveles de 20-OH-P en los medios de incubación sugiere una activación de la conversión de P a su principal metabolito, probablemente como consecuencia de la mayor disponibilidad de sustrato, aunque no se puede descartar un efecto estimulador directo de la insulina sobre la 20 $\alpha$ -HSD.

Si bien la producción basal de progestágenos está aumentada en células luteales provenientes de ratas tratadas *in vivo* con insulina, la respuesta a la LH, medida como producción de P o de 20-OH-P, está disminuida. Sin embargo, los

niveles de AMPc estimulados por LH en los medios de incubación de células luteales no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales. Esto sugiere que la insulina actuaría en una etapa posterior a la formación de AMPc, probablemente sobre alguna de las enzimas que participan en la biosíntesis de esteroides. De todos modos, no se puede descartar que existan pequeños cambios de los niveles de AMPc no detectables con los métodos corrientes, pero suficientes para producir variaciones en la respuesta de las células a la LH. En este sentido, Dufau *et al.* describieron en células de Leydig que la estimulación de la producción de testosterona en presencia de concentraciones tan bajas de LH que no provocan aumentos de los niveles de AMPc se acompaña de un aumento en la fracción del nucleótido cíclico unido a la PKA, y por lo tanto biológicamente relevante para la respuesta a la gonadotropina [96].

Sorprendentemente, el tratamiento con insulina causó una regulación negativa de los receptores de LH en células luteales aisladas. La regulación negativa homóloga de los receptores de LH ha sido extensamente descrita en células ováricas y de Leydig [70,218,222,237,357], pero existen pocos reportes acerca de la regulación *in vivo* por insulina de los receptores de LH. Estados diabéticos crónicos en ratas producen una disminución de los receptores de LH en células luteales y de Leydig [61,389]. Varios estudios han demostrado que tanto la insulina como los factores de crecimiento pueden estimular la inducción por FSH de los receptores de LH en células de granulosa de rata en cultivo [10,81,265,266]. Sin embargo, otros trabajos han mostrado que la insulina inhibe la formación de receptores de LH [102,344]. Además, en células de granulosa porcinas en cultivo, se ha descrito la modulación heteróloga de los receptores de LH por prolactina [63,221]. Utilizando marcación diferencial y técnicas de citometría de flujo, Lane *et al.* demostraron que la prolactina y la LH pueden ser cointernalizadas y atrapadas en los mismos endosomas.

Los autores sugieren que elevados niveles de prolactina inducen una cointernalización de receptores de LH no ocupados y esto proporciona una base celular para la insensibilidad ovárica asociada con la hiperprolactinemia. Un mecanismo similar podría estar teniendo lugar en nuestro modelo experimental. Poretsky *et al.* demostraron que la hiperinsulinemia en ratas adultas produce la regulación negativa de los receptores ováricos de insulina [315].

Resulta difícil establecer si la disminución del número de receptores de LH en células luteales de ratas tratadas *in vivo* con insulina es responsable de la disminución de la respuesta a la gonadotropina. Por un lado, la producción de AMPc en respuesta a la LH no se vio afectada. Sin embargo, como ya fue mencionado, no se puede descartar que existan diferencias en pools endógenos de AMPc. Además, recientemente se ha descrito que el receptor de LH presenta un acoplamiento dual: por un lado se acopla a la adenilato ciclasa y por otro, a la hidrólisis de fosfoinosítidos y movilización de  $Ca^{++}$  [138]. Si bien no se conoce aún qué participación tiene este segundo mecanismo en las acciones de la gonadotropina, es posible que una disminución de los sitios de unión de LH provoque cambios en la movilización de los fosfoinosítidos, sin afectar los niveles de AMPc, pero atenuando la respuesta a la hormona. Por otro lado, en varios tejidos esteroideogénicos está demostrado que para producir la máxima estimulación de la biosíntesis de esteroides alcanza con la ocupación del 1% de los receptores de LH [70]. Esto indicaría que, si bien el tratamiento con insulina disminuye el contenido de receptores de LH en células luteales, la insulina estaría actuando también en una instancia posterior, posiblemente a través de una interacción con los intermediarios de la acción de la LH, como el AMPc.



El estudio del metabolismo de la progesterona en células luteales provenientes de ratas tratadas con insulina no reveló alteraciones en la conversión a andrógenos o a estrógenos. Solamente se pudo comprobar que la 20 $\alpha$ -HSD está activada en estas células, ya que se encontraron niveles más bajos de P y más altos de 20-OH-P que en células controles. Como la función más importante del ovario luteinizado es la producción y secreción de grandes cantidades de progesterona, y no de andrógenos o estrógenos, es posible que la hiperestimulación ovárica asociada con la hiperinsulinemia en células luteales se manifieste principalmente como un aumento en la metabolización de la P a 20-OH-P. Sin embargo, no se puede descartar que existan diferencias en los niveles de otros esteroides, que no se han podido detectar por este método o que se manifiesten a tiempos más largos.

Se ha sugerido que la síntesis del citocromo P450<sub>SCC</sub> podría ser uno de los pasos limitantes de la velocidad de la biosíntesis de esteroides en tejidos esteroideogénicos [142,229,417]. Las hormonas tróficas, como la ACTH o las gonadotrofinas, que actúan por la clásica vía del AMPc, aumentan el contenido proteico y de ARNm del citocromo P450<sub>SCC</sub> y la adrenodoxina en adrenal y en células ováricas [95,120,136,152,204,408,435]. Por medio de una técnica de inmunoblot, hemos observado un incremento del contenido de P450<sub>SCC</sub> mitocondrial en células luteales provenientes de ratas tratadas *in vivo* con insulina. Este podría ser uno de los mecanismos responsables del aumento de la progesterona sérica y de la producción de progestágenos *in vitro* en el grupo I. En concordancia con nuestros resultados, Veldhuis *et al.* demostraron que el IGF-I aumenta la síntesis de citocromo P450<sub>SCC</sub> y adrenodoxina en cultivo células de granulosa porcinas [410]. Como el IGF-I y la insulina actúan a través de un camino independiente de AMPc (comenzando con la fosforilación en tirosina de sus receptores en la membrana plasmática), se ha sugerido un mecanismo alternativo por el cual las células esteroideogénicas responden a la

estimulación hormonal a través de un aumento en la síntesis de componentes del complejo de ruptura de la cadena lateral del colesterol [410].

En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que bajas concentraciones de insulina (0,2 nM) estimulan la producción de progesterona en cultivos de células luteales, un resultado consistente con los sitios de unión de alta afinidad detectados por análisis de Scatchard en células luteales [216,345]. Estos hallazgos sugieren que, tal como ha sido postulado en otros modelos [314,386], en condiciones *in vitro* la insulina actúa a través de sus propios receptores luteales y no por interacción con los receptores de IGF-I. Los resultados de este trabajo no permiten la dilucidación del tipo de receptor involucrado en la estimulación *in vivo* con insulina, ya que es difícil determinar la cantidad de hormona que efectivamente alcanza el cuerpo lúteo.

Por otra parte, no se puede descartar la posibilidad de que otras hormonas cuya secreción es sensible al estado hipoglucémico alcanzado después de la administración de insulina, como la hormona de crecimiento o los corticoides, tengan algún efecto sobre los parámetros investigados o que la acción de la insulina ocurra a nivel hipofisario o hipotalámico, regulando la liberación de gonadotrofinas. Sin embargo, Poretsky *et al.* midieron los niveles séricos de LH y FSH y de varios esteroides (testosterona, estradiol, estrona, androstenodiona, dihidrotestosterona) en ratas hiperinsulinémicas, sin encontrar ninguna alteración respecto de los animales controles [315]. Además, la acción *in vitro* de la insulina mencionada anteriormente sugiere la existencia, también en este modelo, de un efecto directo de la hormona sobre la función luteal.

En resumen, concluimos que el tratamiento *in vivo* con insulina de ratas superovuladas produce un aumento en el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub>, con un incremento concomitante de los niveles de progesterona circulante y de la producción de progestágenos *in vitro*. Por otra parte, la hiperinsulinemia produce una regulación negativa de los receptores de LH luteales. Estos resultados podrían contribuir a la comprensión de algunas disfunciones ováricas observadas frecuentemente en síndromes de resistencia insulínica.

***CONCLUSIONES***

En base a los resultados presentados obtuvimos las siguientes conclusiones:

- Se encontró un aumento de la actividad de fosfodiesterasa en células luteales provenientes de ratas diabéticas por estreptozotocina, que no pudo ser revertido por la terapia sustitutiva con insulina y que no se debería a una activación de la enzima por sustrato.
- Se observó que las células luteales provenientes de ratas de los grupos C y D respondieron a la insulina *in vitro* con un aumento de la actividad de PDE, mientras que en células aisladas de ratas del grupo Ins, la hormona produjo una inhibición de la actividad de PDE.
- La actividad de PDE aumentó en presencia de  $Ca^{++}$  y calmodulina en los tres grupos experimentales. Sin embargo, la estimulación fue mucho menor en los extractos provenientes de ratas D e Ins que en los extractos controles
- La afinidad de la PDE por el AMPc en células luteales de ratas controles, diabéticas o diabéticas tratadas con insulina resultó similar. En cambio, la velocidad máxima de la enzima fue más alta en células luteales de los grupos D e Ins.
- La presencia de un sistema generador de NADPH en el medio de incubación de células luteales aumentó la acumulación de progesterona. La LH amplificó este

efecto estimulador, mientras que el agregado de insulina al SG produjo una inhibición significativa de la acumulación de progesterona.

- La acción del SG no involucra una disminución de la metabolización de la progesterona en células luteales, sino un aumento de su síntesis.
- Utilizando inhibidores específicos de dos enzimas esteroidogénicas, se confirmó que el sitio de acción del NADPH es entre colesterol y pregnenolona, es decir en la ruptura de la cadena lateral del colesterol.
- El SG resultó estimulador de la acumulación de progesterona en células luteales purificadas y en cultivo, demostrando que el NADPH atraviesa la membrana plasmática de células luteales intactas y ejerce su acción estimuladora sobre la producción de progesterona.
- El IGF-I aumentó los niveles de progesterona secretada por las células luteales solamente luego de 24 hs de cultivo y a la mayor dosis ensayada (100 ng/ml), lo que sugiere que el factor de crecimiento actuaría a través de los receptores de insulina en estas células.
- La insulina estimula la acumulación de P y 20-OH-P de células luteales a concentraciones fisiológicas, indicando que su efecto se ejerce por interacción con sus propios receptores.

- Se observó un aumento en el contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub> en cultivos de células luteales en presencia de insulina, por un mecanismo que no involucraría la estimulación de la síntesis *de novo* de la proteína.
- El tratamiento *in vivo* con insulina a ratas superovuladas produjo un aumento de la producción de progestágenos, encontrándose una disminución de los niveles de P y un aumento de los niveles de 20-OH-P.
- La respuesta a la LH de células luteales provenientes de ratas tratadas *in vivo* con insulina resultó disminuida, tanto para la acumulación de P como de 20-OH-P
- Se observó una disminución del número de sitios receptores de LH/hCH en células luteales del grupo I.
- Se encontró un aumento del contenido de citocromo P450<sub>SCC</sub> en células luteales provenientes de ratas tratadas *in vivo* con insulina

Los resultados obtenidos en la presente tesis contribuyen a dilucidar el funcionamiento y regulación del cuerpo lúteo, instancia fundamental en la fase postovulatoria del ciclo estral o en las primeras etapas de la preñez o embarazo. Por otro lado, aclararían la patogénesis de diversas enfermedades, como poliquistosis, hiperandrogenismo, diabetes mellitus y diversos síndromes de resistencia insulínica y acantosis nigricans.

## ***BIBLIOGRAFIA***



1. **(1980)**. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus: Second report. WHO Tech.Rep.Ser 646
2. **Abel J.J. (1926)**. Crystalline insulin. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 12:132-136.
3. **Abraham G.E., Swerdloff R., Tulchinsky D., Odell W.D. (1971)**. Radioimmunoassay of plasma progesterone. J.Clin.Endocrinol.Metab. 32:619-624.
4. **Adams M.J., Blundell T.L., Dodson E.J., Dodson G.G., Vijayan M., Baker E.N., Harding M.M., Hodgkin D.C., Rimmer B., Sheat S. (1969)**. Structure of rhombohedral 2 zinc insulin crystals. Nature 224:491-495.
5. **Adashi E.Y. (1992)**. Intraovarian regulation: The IGF-I example. Reprod.Fertil.Dev. 4:497-504.
6. **Adashi E.Y., Resnick C.E., Brodie A.M.H., Svoboda M.E., Van Wyk J.J. (1985)**. Somatomedin-C mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. Endocrinology 117:2313-2320.
7. **Adashi E.Y., Resnick C.E., D'Ercole A.J., Svoboda M.E., Van Wyk J.J. (1985)**. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. Endocr.Rev. 6:400-420.
8. **Adashi E.Y., Resnick C.E., Hernandez E.R., Svoboda M.E., Van Wyk J.J. (1988)**. Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for Somatomedin-C/insulin-like growth factor I in cultured rat granulosa cells. Endocrinology 122:194-201.
9. **Adashi E.Y., Resnick C.E., Svoboda M.E., Van Wyk J.J. (1985)**. Somatomedin-C synergizes with follicle-stimulating hormone in the acquisition of

- progesterin biosynthetic capacity by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 116:2135-2142.
10. **Adashi E.Y., Resnick C.E., Svoboda M.E., Van Wyk J.J. (1985).** Somatomedin-C enhances induction of luteinizing hormone receptors by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 116:2369.
  11. **Adashi E.Y., Resnick C.E., Svoboda M.E., Van Wyk J.J., Hascall V.C., Yanagishita M. (1986).** Independent and synergistic action of Somatomedin-C in the stimulation of proteoglycan biosynthesis by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 118:456-458.
  12. **Alden R.H. (1942).** The periovarial sac in the albino rat. *Anat.Rec.* 83:421-433.
  13. **Alila H.W., Hansel W. (1984).** Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol.Reprod.* 31:1015-1025.
  14. **Amsterdam A., Lindner H.R., Groschel-Steward U. (1977).** Localization of actin and myosin in the rat oocyte and follicular wall by immunofluorescence. *Anat.Rec.* 187:311-328.
  15. **Anderson D., Koch C.A., Grey L., Ellis C., Moran M.F., Pawson T. (1990).** Binding of SH2 domains of phospholipase C $\gamma$ 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* 250:979-982.
  16. **Anderson E., Little B. (1985).** The ontogeny of the rat granulosa cell. p. 203-225. En: Toft D.O., Ryan R.J. (eds.). *Proceedings of the Fifth Ovarian Workshop. Ovarian Workshops, Champaign, IL.*

17. **Angerwall L. (1959).** Alloxan diabetes and pregnancy in the rat: effects of offspring. *Acta Endocrinol.(Suppl.)* 31:81-86.
18. **Armstrong D.T., Black D.L. (1966).** Influence of luteinizing hormone on corpus luteum metabolism and progesterone biosynthesis throughout the bovine estrous cycle. *Endocrinology* 78:937-944.
19. **Armstrong D.T., Dorrington J.H., Robinson J. (1976).** Effects of indomethacin and aminoglutethimide phosphate in vivo on luteinizing-hormone-induced alterations on cyclic adenosine monophosphate, prostaglandin F, and steroid levels in preovulatory rat ovaries. *Can.J.Biochem.* 54:796-802.
20. **Ascoli M., Puett D. (1978).** Inhibition of the degradation of receptor-bound human chorionadotropin by lysosomotropic agents, protease inhibitors, and metabolic inhibitors. *J.Biol.Chem.* 253:7839-7843.
21. **Azhar S., Menon K.M.J. (1975).** Adenosine 3',5'-monophosphate dependent phosphorylation of ribosomes and ribosomal subunits from bovine corpus luteum. *Biochim.Biophys.Acta* 392:64-74.
22. **Babbot D., Rubin A., Ginsburg S.J. (1958).** The reproductive characteristics of diabetic men. *Diabetes* 7:33-35.
23. **Backer J.M., Kahn C.R., Cahill D.A., Ullrich A., White M.F. (1990).** Receptor-mediated internalization of insulin receptor requires a 12-amino acid sequence in the juxtamembrane region of the insulin receptor  $\beta$ -subunit. *J.Biol.Chem.* 265:16450-16454.
24. **Backer J.M., Myers Jr M.G., Shoelson S.E., Chin D.J., Sun X.J., Miralpeix M., Hu P., Margolis B., Skolnik E.Y., Schlessinger J., White M.F. (1992).**

- Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* 11:3469-3479.
25. **Bagavandoss P., Midgley A.R.Jr., Wicha M. (1983).** Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J.Histochem.Cytochem.* 31:633-640.
  26. **Baird D.T., Fraser I.S. (1975).** Concentrations of oestrone and oestradiol-17 $\beta$  in follicular fluid and ovarian venous blood of women. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)* 4:259-266.
  27. **Balboni G.C., Vanelli G.B., Berni T., Orlando C., Serio M. (1987).** Transferrin and Somatomedin-C receptors in the human ovarian follicles. *Fertil.Steril.* 48:796-801.
  28. **Ball E.H., Seth P.K., Sanwal B.D. (1980).** Regulatory mechanisms involved in the control of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterases in myoblasts. *J.Biol.Chem.* 255:2962-2968.
  29. **Baltensperger K., Kozma L.M., Cherniack A.D., Klarlund J.K., Chawla A., Banerjee U., Czech M.P. (1993).** Binding of the Ras activator Son of sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes. *Science* 260:1950-1952.
  30. **Banting F.G., Best C.H. (1922).** Internal secretion of pancreas. *J.Lab.Clin.Med.* 7:251-266.
  31. **Baraño J.L.S., Hammond J.M. (1984).** Comparative effect of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 124:484-490.

32. **Barbieri R.L., Makris A., Ryan K.J. (1983).** Effects of insulin on steroidogenesis in cultured porcine ovarian theca. *Fertil.Steril.* 40:237-241.
33. **Barbieri R.L., Makris A., Ryan K.J. (1984).** Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of human ovarian stroma and theca. *Obstet.Gynecol.* 64:73S-78S.
34. **Barbieri R.L., Ryan K.J. (1983).** Hyperandrogenism, insulin resistance, and acanthosis nigricans syndrome: a common endocrinopathy with distinct pathophysiologic features. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 147:90.
35. **Basset D.L. (1943).** The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am.J.Anat.* 73:251-291.
36. **Batta S.K., Wentz A.C., Channing C.P. (1980).** Steroidogenesis by human ovarian cell types in culture: influence of mixing of cell types and effect of added testosterone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 50:274-279.
37. **Beers W.H. (1975).** Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effect of plasmin on ovarian follicular wall. *Cell* 6:379-386.
38. **Behrman H., Grinwich D.H., Hichens M., MacDonald G.J. (1978).** Effect of hypophysectomy, prolactin and prostaglandin F<sub>2α</sub> on gonadotropin binding in vivo and in vitro in the corpus luteum. *Endocrinology* 103:349-357.
39. **Bergqvist N. (1954).** Gonadal function in female diabetics. *Acta Endocrinol.(Copenh.)* 19:3-12.
40. **Bicsak T.A., Shimonaka M., Malkowski M., Ling N. (1990).** Insulin-like growth factor binding protein (IGF-BP) inhibition of granulosa cell function: effect on

- cyclic 3',5'-monophosphate, deoxyribonucleic acid synthesis, and comparison with the effect of an IGF-I antibody. *Endocrinology* 126:2184-2189.
41. **Billig H., Thelander H., Rosberg S. (1988).** Adenosine receptor-mediated effects by nonmetabolizable adenosine analogs in preovulatory rat granulosa cells: a putative local regulatory role of adenosine in the ovary. *Endocrinology* 122:52-61.
  42. **Blankenstein M.A., Van Woerkom-Blik A., Janszen F.H.A., Van Der Molen H.J. (1976).** Effect of cofactors and luteinizing hormone on testosterone production by rat testis preparations. *J. Steroid Biochem.* 7:445-450.
  43. **Blenis J. (1993).** Signal transduction via the MAP kinases: Proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5889-5892.
  44. **Bley M.A., Simón J.C., Estévez A.G., Jiménez de Asúa L., Barañao J.L. (1992).** Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 131:1223-1229.
  45. **Bonfini L., Karlovich C.A., Dasgupta C., Banerjee U. (1992).** The Son of sevenless gene product: A putative activator of Ras. *Science* 255:603-606.
  46. **Bowtell D., Fu P., Simon M., Senior P. (1992).** Identification of murine homologues of the *Drosophila* Son of sevenless gene: Potential activators of ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6511-6515.
  47. **Buday L., Downward J. (1993).** Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73:611-620.

48. **Burger H.G., Zhiwen Z., Davis S., Lee V., Carson R.S., Herington A., Findlay J.K., Farnworth P., Wang Q.-F., Au S., De Kretser D.M., Robertson D.M. (1988).** Inhibin-regulation and mechanism of action. p. 137-148. En: Hodgen G.D., Rosenwacks Z. (eds.). First Conrad International Workshop on Non-Steroidal Gonadal Factors: Physiological Roles and Possibilities in Contraceptive Development. Jones Institute Press, Virginia.
49. **Butcher R.L., Collins W.E., Fugo N.W. (1974).** Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94:1704-1708.
50. **Caffrey J.L., Fletcher P.W., Diekman M.A., O'Callaghan P.L., Niswender G.D. (1979).** The activity of ovine luteal cholesterol esterase during several experimental conditions. *Biol.Reprod.* 21:601-608.
51. **Caffrey J.L., Nett T.M., Abel J.H.Jr., Niswender G.D. (1979).** Activity of 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -steroid dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$ -isomerase in the ovine corpus luteum. *Biol.Reprod.* 20:279-287.
52. **Cantley L.C., Auger K.R., Carpenter C., Duckworth B., Graziani A., Kapeller R., Soltoff S. (1991).** Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64:281-302.
53. **Capeau J., Picard J. (1980).** The influence of glycosidases and lectins on insulin binding to Zajdela hepatoma cells. *FEBS Lett.* 118:25-30.
54. **Cara J.F., Rosenfield R.L. (1988).** Insulin-like growth factor I and insulin potentiate luteinizing hormone-induced androgen synthesis by rat ovarian thecal-interstitial cells. *Endocrinology* 123:733-739.

55. **Caron M.G., Goldstein S., Savard K., Marsh J. (1975).** Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *J.Biol.Chem.* 250:5137-5143.
56. **Carpentier J.L., Paccaud J.P., Gorden P., Rutter W.J., Orci L. (1992).** Insulin-induced surface redistribution regulates internalization of the insulin receptor and requires its autophosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:162-166.
57. **Catt K.J., Harwood J.P., Richert N.P., Conn P.M., Conti M., Dufau M.L. (1978).** Luteal desensitization: hormone regulation of LH receptors, adenylate cyclase and responses in the luteal cell. p. 647-662. En: Channing C.P., Marsh J., Sadler W.A. (eds.). *Ovarian follicular and corpus luteum function.* Plenum Press, New York.
58. **Chang S.C.S., Jones J.D., Ellefson R.D., Ryan R.J. (1976).** The porcine ovarian follicle: I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biol.Reprod.* 15:321-328.
59. **Channing C., Kammerman S. (1974).** Binding of gonadotropins to ovarian cells. *Biol.Reprod.* 10:179-198.
60. **Channing C.P., Schaerf F.W., Anderson L.D., Tsafiriri A. (1980).** Ovarian follicular and luteal physiology. p. 117-201. En: Greep R.O. (ed.). *Reproductive Physiology III, International Review of Physiology.* University Park Press, Baltimore.
61. **Charreau E.H., Calvo J.C., Tesone M., Biella de Souza Valle L., Barañao J.L. (1978).** Insulin regulation of Leydig cell luteinizing hormone receptors. *J.Biol.Chem.* 253:2504-2506.



62. **Chen T.T., Abel J.H., McClellan M.C., Sawyer H.R., Niswender G.D. (1977).** Localization of gonadotropic hormones in lysosomes of ovine luteal cells. *Cytobiologie* 14:412-420.
63. **Chen T.T., Gao K., Shelton M.A., Hatmaker D.D. (1987).** Coordinated receptor regulation in ovarian granulosa cells. p. 703-707. En: Mahesh V.B., Dhindsa D.S., Anderson E., Kalra S.P. (eds.). *Advances in experimental medicine and biology*. Plenum Press, New York.
64. **Chou C.K., Dull T.J., Russell D.S., Gherzi R., Lebwohl D., Ullrich A., Rosen O.M. (1987).** Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J.Biol.Chem.* 262:1842-1847.
65. **Clark S.G., Stern M.J., Horvitz H.R. (1992).** *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* 356:340-344.
66. **Cohen P. (1993).** Dissection of the protein phosphorylation cascades involved in insulin and growth factor action. *Biochem.Soc.Trans.* 21:555-567.
67. **Constantopoulos G., Tchen T.T. (1961).** Cleavage of cholesterol side chain by adrenal cortex. *J.Biol.Chem.* 236:65-67.
68. **Conti M., Harwood J.P., Dufau M.L., Catt K.J. (1977).** Effect of gonadotropin-induced receptor regulation on biological responses of isolated rat luteal cells. *J.Biol.Chem.* 252:8869-8874.
69. **Conti M., Harwood J.P., Dufau M.L., Catt K.J. (1977).** Regulation of luteinizing hormone receptors and adenylate cyclase activity by gonadotrophin in the rat ovary. *Mol.Pharmacol.* 13:1024-1032.

70. **Conti M., Harwood J.P., Hsueh A.J.W., Dufau M.L., Catt K.J. (1976).** Gonadotropin-induced loss of hormone receptors and desensitization of adenylate cyclase in the ovary. *J.Biol.Chem.* 251:7729-7731.
71. **Conti M., Kasson B.G., Hsueh A.J.W. (1984).** Hormonal regulation of 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterases in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 114:2361-2368.
72. **Cook B., Kaltenbach C.C., Norton H.W., Nalbandov A.V. (1967).** Synthesis of progesterone in vitro by porcine corpora lutea. *Endocrinology* 81:573-584.
73. **Couët J., Martel C., Dupont E., Luu-The V., Sirard M.-A., Zhao H.-F., Pelletier G., Labrie F. (1990).** Changes in  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$  isomerase messenger ribonucleic acid, activity and protein levels during the estrous cycle in the bovine ovary. *Endocrinology* 127:2141-2148.
74. **Coughlin S.R., Escobedo J.A., Williams L.T. (1989).** Role of phosphatidylinositol kinase in PDGF receptor signal transduction. *Science* 243:1191-1194.
75. **Csapo A.I., Wiest W.G. (1969).** An examination of the quantitative relationship between progesterone and the maintenance of pregnancy. *Endocrinology* 85:735-746.
76. **d'Armiento M., Johnson G.S., Pastan I. (1972).** Regulation of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase activity in fibroblasts by intracellular concentrations of cyclic adenosine monophosphate. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 69:459-462.

77. **Daniel S.A.J., Armstrong D.T. (1980).** Enhancement of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity by androgens in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 107:1027-1033.
78. **Davis M.E., Fugo N.W., Lawrence K.G. (1947).** Effect of alloxan diabetes on reproduction in the rat. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 66:638-641.
79. **Davoren J.B., Hsueh A.J.W. (1984).** Insulin enhances FSH-stimulated steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Mol.Cell.Endocrinol.* 35:97-105.
80. **Davoren J.B., Hsueh A.J.W. (1986).** Growth hormone increases ovarian levels of immunoreactive somatomedin-C/insulin-like growth factor I in vivo. *Endocrinology* 118:888-891.
81. **Davoren J.B., Kasson B.G., Li C.H., Hsueh A.J.W. (1986).** Specific insulin-like growth factor (IGF) I- and II-binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. *Endocrinology* 119:2155-2162.
82. **de Graaf, R. (1672).** *De Mulierum Organis Generationi Inservientibus Tractatus Novus.*
83. **De Jong F.H. (1988).** Inhibin. *Physiol.Rev.* 68:555-607.
84. **Denton R.M., Brownsey R.W., Belsham G.J. (1981).** A partial view of the mechanism of insulin action. *Diabetologia* 21:347-362.
85. **Deutsch P.J., Wang C.F., Rosen O.M., Rubin C.S. (1983).** Latent insulin receptors and possible receptor precursors in 3T3-L1 adipocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80:133-136.

86. **Dexter R.N., Fishman L.M., Ney R.L., Liddle G.W. (1967).** Inhibition of adrenal corticosteroid synthesis by aminoglutethimide: studies of the mechanism of action. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 27:473-480.
87. **Dharmarajan A.M., Bruce N.W., Meyer G.T. (1985).** Quantitative ultrastructural characteristics relating to transport between luteal cell cytoplasm and blood in the corpus luteum of the pregnant rat. *Am.J.Anat.* 172:87-99.
88. **Diekman M.A., O'Callaghan P.L., Nett T.M., Niswender G.D. (1978).** Validation of methods and quantification of luteal receptors for LH throughout the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol.Reprod.* 19:999-1009.
89. **Dieleman S.J., Bevers M.M., Poortman J., van Tol H.T.M. (1983).** Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. *J.Reprod.Fertil.* 69:641-649.
90. **diZerega G.S., Turner C.K., Stouffer R.L., Anderson L.D., Channing C.P., Hodgen G.D. (1981).** Suppression of follicle-stimulating hormone-dependent folliculogenesis during the primate ovarian cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 52:451-456.
91. **Djursing H., Nyholm H.C., Hagen C., Carstensen L., Pedersen L.M. (1982).** Clinical and hormonal characteristics in women with anovulation and insulin-treated diabetes mellitus. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 143:876-882.
92. **Donaldson L., Hansel W. (1965).** Histological study of the bovine corpora lutea. *J.Dairy Sci.* 48:905-909.
93. **Dorrington J.H., Armstrong D.T. (1979).** Effects of FSH on gonadal functions. *Recent Prog.Horm.Res.* 35:301-342.

94. **Draznin B., Trowbridge M. (1982).** Inhibition of intracellular proteolysis by insulin in isolated rat hepatocytes. Possible role of internalized hormone. *J.Biol.Chem.* 257:11988-11993.
95. **DuBois R.N., Simpson E.R., Kramer R.E., Waterman M.R. (1981).** Induction of synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 by adrenocorticotropin in cultured bovine adrenocortical cells. *J.Biol.Chem.* 256:7000-7005.
96. **Dufau M.L., Tsuruhara T., Horner K.A., Podestá E., Catt K.J. (1977).** Intermediate role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and protein kinase during gonadotropin-induced steroidogenesis in testicular interstitial cells. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 74:3419-3423.
97. **Ebina Y., Araki E., Taira M., Shimada F., Mori M., Craik C.S., Siddle K., Pierce S.B., Roth R.A., Rutter W.J. (1987).** Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 84:704-708.
98. **Edwards R.G. (1974).** Follicular fluid. *J.Reprod.Fertil.* 37:189-219.
99. **Enders A.C. (1973).** Cytology of the corpus luteum. *Biol.Reprod.* 8:158-182.
100. **Eppig J.J. (1979).** Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion in vitro. *J.Exp.Zool.* 208:111-120.
101. **Eppig J.J. (1979).** FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 281:483-484.

102. **Erickson G.F., Casper R., Hofeditz C. (1983).** Role of serum-free defined medium in regulation of LH receptor in cultured rat granulosa cells. *Mol.Cell.Endocrinol.* 30:37-50.
103. **Erickson S.K., Meyer D.J., Gould F.T. (1978).** Purification and characterization of a new cholesterol binding protein from rat liver cytosol. *J.Biol.Chem.* 253:1817-1826.
104. **Espey L.L. (1974).** Ovarian proteolytic enzymes and ovulation. *Biol.Reprod.* 10:216-235.
105. **Farkash Y., Timberg R., Orly J. (1986).** Preparation of antiserum to rat cytochrome P-450 cholesterol side chain cleavage, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinology* 118:1353-1365.
106. **Feener E.P., Backer J.M., King G.L., Wilden P.A., Sun X.J., Kahn C.R., White M.F. (1993).** Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *J.Biol.Chem.* 268:11256-11264.
107. **Feig L.A. (1993).** The many roads that lead to Ras. *Science* 260:767-768.
108. **Ferguson J.J.Jr. (1962).** Puromycin and adrenal responsiveness to adrenocorticotrophic hormone. *Biochim.Biophys.Acta* 57:616-617.
109. **Findlay J.K. (1986).** Angiogenesis in reproductive tissues. *J.Endocrinol.* 111:357-366.

110. **Finn C.A., Booth J.E. (1977).** The physiological effects of estrogens and progesterone. p. 151-225. En: Zuckerman S., Weir B.J. (eds.). The ovary. Academic, New York/London.
111. **Fletcher P.W., Niswender G.D. (1982).** Effect of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  on progesterone secretion and adenylate cyclase activity in ovine luteal tissue. Prostaglandins 20:803-818.
112. **Flier J.S., Minaker K.L., Landsberg L., Young J.B., Pallotta J., Rowe J.W. (1982).** Impaired in vivo insulin clearance in patients with severe target-cell resistance to insulin. Diabetes 31:132-135.
113. **Flockhart D.A., Corbin J.D. (1982).** Regulatory mechanisms in the control of protein kinases. CRC Crit.Rev.Biochem. 12:133-186.
114. **Foglia V.G., Borghelli R.F., Chieri R.A., Fernández-Collazo E.L., Spindler I., Wesely O. (1963).** Sexual disturbances in the diabetic rat. Diabetes 12:231-237.
115. **Foglia V.G., Spindler I.J., Borghelli R.F. (1961).** Modificaciones del tracto genital de la rata hembra diabética. Rev.Soc.Arg.Biol. 37:106-111.
116. **Forsayeth J., Maddux B., Goldfine I.D. (1986).** Biosynthesis and processing of the human insulin receptor. Diabetes 35:837-846.
117. **Freeman R.M., Jr., Plutzky J., Neel B.G. (1992).** Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: A putative homolog of *Drosophila* corkscrew. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:11239-11243.
118. **Froesch E.R., Schmid C., Schwander J., Zapf J. (1985).** Actions of insulin-like growth factors. Ann.Rev.Physiol. 47:443-467.

119. **Fujii T., Hoover D.J., Channing C.P. (1983).** Changes in inhibin activity, and progesterone, oestrogen and androstenedione concentrations in rat follicular fluid throughout the oestrous cycle. *J.Reprod.Fertil.* 69:307-314.
120. **Funkenstein B., Waterman M.R., Siler Masters B.S., Simpson E.R. (1983).** Evidence for the presence of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin in fresh granulosa cells. *J.Biol.Chem.* 258:10187-10191.
121. **Gabbe S.G. (1981).** Diabetes mellitus in pregnancy: have all the problems been solved? *Am.J.Med.* 70:613-618.
122. **Gaede S.D., Sholley M.M., Quattropiani S.L. (1985).** Endothelial mitosis during the initial stages of corpus luteum neovascularization in the cyclic adult rat. *Am.J.Anat.* 172:173-180.
123. **Garren L.D. (1968).** The mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone. *Vitam.Horm.* 26:119-145.
124. **Garzo G., Dorrington J.H. (1984).** Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle-stimulating hormone and insulin. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 148:657-662.
125. **Gates G.S., Bayer S., Seibel M., Poretsky L., Flier J.S., Moses A.C. (1987).** Characterization of insulin-like growth factor binding to human granulosa cells obtained during in vitro fertilization. *J.Receptor Res.* 7:885-902.
126. **Gavin III J.R., Roth J., Neville Jr D.M., De Meyts P., Buell D.N. (1974).** Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 71:84-88.



127. **Ghosh D.K., Dunham W.R., Sands R.H., Menon K.M.J. (1987).** Regulation of cholesterol side-chain cleavage enzyme activity by gonadotropin in rat corpus luteum. *Endocrinology* 121:21-27.
128. **Gibori G., Keyes P.L., Richards J.S. (1978).** A role for intraluteal estrogen in the mediation of luteinizing hormone action in the rat corpus luteum during pregnancy. *Endocrinology* 103:162-169.
129. **Gibori G., Richards J.S., Keyes P.L. (1979).** Synergistic effects of prolactin and estradiol in the luteotropic process in the pregnant rat: regulation of estradiol receptor by prolactin. *Biol.Reprod.* 21:419-423.
130. **Gilula N.B., Epstein M.L., Beers W.H. (1978).** Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J.Cell.Biol.* 78:58-75.
131. **Giordano G., Barreca A., Minuto F. (1992).** Growth factors in the ovary. *J.Endocrinol.Invest.* 15:689-707.
132. **Giudice L.C. (1992).** Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr.Rev.* 13:641-669.
133. **Goff A.K., Henderson K.M. (1979).** Changes in follicular fluid and serum concentrations of steroids in PMS-treated immature rats following LH administration. *Biol.Reprod.* 20:1153-1157.
134. **Goldenberg R.L., Vaitukaitis J.L., Ross G.T. (1972).** Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 90:1492-1498.

135. **Goldman A.S. (1967).** Inhibition of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni* by various estrogenic and progestinic steroids. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 27:320-324.
136. **Goldring N.B., Durica J.M., Lifka J., Hedin L., Ratoosh S.L., Miller W.L., Orly J., Richards J.S. (1987).** Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid: evidence for hormonal regulation in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea. *Endocrinology* 120:1942-1950.
137. **Grodsky G.M., Batts A.A., Bennett L.L., Vcella C., McWilliams N.B., Smith D.F. (1963).** Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas. *Am.J.Physiol.* 205:638-644.
138. **Gudermann T., Birnbaumer M., Birnbaumer L. (1992).** Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and  $Ca^{2+}$  mobilization. *J.Biol.Chem.* 267:4479-4488.
139. **Halkerston I.D.K. (1968).** p. 399-461. En: McKerns K.W. (ed.). *Functions of the adrenal cortex.* North Holland, Amsterdam.
140. **Halkerston I.D.K., Eichhorn J., Hechter O. (1961).** A requirement for reduced triphosphopyridine nucleotide for cholesterol side-chain cleavage by mitochondrial fractions of bovine adrenal cortex. *J.Biol.Chem.* 236:374-380.
141. **Hall A.K., Robinson J. (1978).** Progesterone,  $20\alpha$ -dihydroprogesterone and PGF; interrelated hormonal changes during pseudopregnancy in the rat. *Prostaglandins* 15:1013-1025.
142. **Hall P.F. (1984).** Cellular organization for steroidogenesis. *Int.Rev.Cytol.* 86:53-95.

143. **Hall P.F. (1985).** Trophic stimulation of steroidogenesis: in search of the elusive trigger. *Recent Prog.Horm.Res.* 4:1-31.
144. **Hall P.F., Koritz S.B. (1964).** The conversion of cholesterol and 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol to steroids by acetone powder of particles from bovine corpus luteum. *Biochemistry* 3:129-134.
145. **Hammond J.M., Baraňao J.L.S., Skaleris D.A., Knight A.B., Romanus J.A., Rechler M.M. (1985).** Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 117:2553-2555.
146. **Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. (1990).** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domain. *Science* 241:42-52.
147. **Hansel W., Concannon P.W., Lukaszewska J.H. (1973).** Corpora lutea of the large domestic animals. *Biol.Reprod.* 8:222-245.
148. **Hanukoglu I. (1989).** Molecular biology of cytochrome P450 systems in steroidogenic tissues. p. 233-252. En: Tsafiriri A., Dekel N. (eds.). *Follicular Development and the ovulatory response.* Serono Symposia, Roma.
149. **Harrison R.J., Matthews L.H. (1951).** Sub-surface cypts in the cortex of the mammalian ovary. *Proc.Zool.Soc.Lond.* 120:699-712.
150. **Harwood J.P., Conti M., Conn P.M., Dufau M.L., Catt K.J. (1978).** Receptor regulation and target cell responses: studies in the ovarian luteal cell. *Mol.Cell.Endocrinol.* 11:121-135.

151. **Hashimoto I., Wiest W.G. (1969).** Luteotropic and luteolytic mechanisms in rat corpora lutea. *Endocrinology* 80:886-892.
152. **Hatey F., Gasparoux J.P., Mulsant P., Bonnet A., Gasser F. (1992).** P450<sub>scc</sub> regulation in pig granulosa cells: Investigation into the mechanism of induction. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43:869-874.
153. **Hawkins D.E., Belfiore C.J., Niswender G.D. (1993).** Regulation of mRNA encoding 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$  isomerase (3 $\beta$ -HSD) in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 48:1185-1190.
154. **Hedo J.A., Kasuga M., Van Obberghen E., Roth J., Kahn C.R. (1981).** Direct demonstration of glycosylation of insulin receptor subunits by biosynthetic and external labeling evidence for heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4791-4795.
155. **Helmond F.A., Simons P.A., Hein P.R. (1980).** The effects of progesterone on estrogen-induced luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in the female rhesus monkey. *Endocrinology* 107:478-485.
156. **Hermier C., Combarous Y., Justisz M. (1971).** Role of a regulating protein and molecular oxygen in the mechanism of action of luteinizing hormone. *Biochim. Biophys. Acta* 244:625-633.
157. **Hernandez E.R., Hurwitz A., Vera A., Pellicer A., Adashi E.Y., LeRoith D., Roberts C.T., Jr. (1992).** Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74:419-425.
158. **Hernandez E.R., Resnick C.E., Holtzclaw W.D., Payne D.W., Adashi E.Y. (1988).** Insulin as a regulator of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells:

cellular mechanism(s) underlying physiological and pharmacological hormonal actions. *Endocrinology* 122:2034-2043.

159. **Heyworth C.M., Wallace A.V., Wilson S.R., Houslay M.D. (1984).** An assessment of the ability of insulin-stimulated cyclic AMP phosphodiesterase to decrease hepatocyte intracellular cyclic AMP concentrations. *Biochem.J.* 222:183-187.
160. **Hillensjo T., Bauminger S., Ahren K. (1976).** Effect of luteinizing hormone on the pattern of steroid production by preovulatory follicles of pregnant mare's serum gonadotropin-injected immature rats. *Endocrinology* 99:996-1002.
161. **Hilliard J. (1973).** Corpus luteum function in guinea pigs, hamsters, rats, mice and rabbits. *Biol.Reprod.* 8:203-211.
162. **Hillier S.G., De Zwart F.A. (1981).** Evidence that granulosa cell aromatase induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in-vitro. *Endocrinology* 109:1303-1305.
163. **Hillier S.G., Knazek R.A., Ross G.T. (1977).** Androgenic stimulation of progesterone production by granulosa cells from preantral ovarian follicles: further in vitro studies using replicate cell cultures. *Endocrinology* 100:1539-1549.
164. **Hillier S.G., Reichert L.E.Jr., van Hall E.V. (1981).** Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 52:847-856.
165. **Hillier S.G., van der Boogaard A.M.J., Reichert L.E.Jr., van Hall E.V. (1980).** Intraovarian sex steroid hormone interactions and the regulation of follicular maturation: aromatization of androgens by human granulosa cells in vitro. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 50:640-647.

166. **Hochberg R.B., vader Hoeven T.A., Welch S., Lieberman S. (1974).** A simple and precise assay of the enzymatic conversion of cholesterol into pregnenolone. *Biochemistry* 13:603-609.
167. **Hoffman Y.M., Peegel H., Sprock M.J.E., Zhang Q.-Y., Menon K.M.J. (1991).** Evidence that human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor down-regulation involves decreased levels of receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 128:388-393.
168. **Hoftiezer V., Carpenter A.M. (1973).** Comparison of streptozotocin and alloxan-diabetes in the rat, including volumetric quantitation of the pancreatic islets. *Diabetologia* 9:178-184.
169. **Hori T., Ide M., Miyake T. (1969).** Pituitary regulation of preovulatory oestrogen secretion in the rat. *Endocrinol.Jpn.* 16:351-360.
170. **Horstmann L. (1950).** The excretion of androgens in human diabetes mellitus. *Acta Endocrinol.(Copenh.)* 5:261-269.
171. **Howe L.R., Leever S.J., Gómez N., Nakielny S., Cohen P., Marshall C.J. (1992).** Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71:335-342.
172. **Hsu C.J., Hammond J.M. (1987).** Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 126:2184-2189.
173. **Hubbard C.J., Greenwald G.S. (1982).** Cyclic nucleotides, DNA, and steroid levels in ovarian follicles and corpora lutea of the cyclic hamster. *Biol.Reprod.* 26:230-240.

174. **Hughes D.A., Ashworth A., Marshall C.J. (1993).** Complementation of *byr1* in fission yeast by mammalian MAP kinase kinase requires coexpression of Raf kinase. *Nature* 364:349-352.
175. **Hunter T., Karin M. (1992).** The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70:375-387.
176. **Hunzicker-Dunn M., Birnbaumer L. (1976).** Adenylate cyclase activities in ovarian tissues. IV. Gonadotropin-induced desensitization of luteal adenyl cyclase throughout pregnancy and pseudopregnancy in the rabbit and rat. *Endocrinology* 99:211-222.
177. **Inaba T., Weist W.G. (1985).** Protein kinase stimulation of steroidogenesis in rat luteal cell mitochondria. *Endocrinology* 117:315-322.
178. **Ingebritsen T.S., Foulkes J.G., Cohen P. (1983).** The protein phosphatases involved in cellular regulation. 2. Glycogen metabolism. *Eur.J.Biochem.* 132:263-274.
179. **Ingebritsen T.S., Foulkes J.G., Cohen P. (1983).** The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles. *Eur.J.Biochem.* 132:297-307.
180. **Iwamoto Y., Roach E., Bailey A., Williams J.A., Goldfine I.D. (1983).** The effect of chloroquine on the binding, intracellular distribution, and action of insulin on isolated mouse pancreatic acini. *Diabetes* 32:1102-1109.
181. **Jacobs S., Cuatrecasas P. (1981).** Insulin receptor: structure and function. *Endocrinol.Rev.* 2:251-263.

182. **Jarret J.C., Ballejo G., Tsibris J.C.M., Spellacy W.N. (1985).** Insulin binding to human ovaries. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 60:460-465.
183. **Jia X.-C., Oikawa M., Bo M., Tanaka T., Boime I., Hsueh A.J.W. (1991).** Expression of human luteinizing hormone (LH) receptor: interaction with LH and chorionic gonadotropin from human but not equine, rat, and ovine species. *Mol.Endocrinol.* 5:759-768.
184. **Jonassen J.A., Bose K., Richards J.S. (1982).** Enhancement and desensitization of hormone-responsive adenylate cyclase in granulosa cells of preantral and antral ovarian follicles: effects of estradiol and follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 111:74-79.
185. **Jonassen J.A., Richards J.S. (1980).** Granulosa cell desensitization: effects of gonadotropins on antral and preantral follicles. *Endocrinology* 106:1786-1794.
186. **Jungmann R.A., Hunzicker-Dunn M. (1978).** Mechanism of action of gonadotropins and the regulation of gene expression. p. 1-29. En: McKerns K.W. (ed.). *Structure and function of the gonadotropins.* Plenum Press, New York.
187. **Junod A., Lambert A.E., Orci L., Pictet R., Gonet A.E., Renold A.E. (1967).** Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 126:201-205.
188. **Kadowaki H., Kadowaki T., Cama A., Marcus-Samuels B., Rovira A., Bevins C., Taylor S.I. (1990).** Mutagenesis of lysine-460 in the human insulin receptor: effects upon receptor recycling and site-site interactions among binding sites. *J.Biol.Chem.* 265:21285-21296.



189. **Kahn C.R., Crettaz M. (1985).** Insulin receptors and the molecular mechanism of insulin action. *Diabetes/Metabolism Rev.* 1:5-32.
190. **Kaltenbach C.C., Cook B., Niswender G.D., Nalbandov A.V. (1967).** Effect of pituitary hormones on progesterone synthesis by ovine luteal tissue in vitro. *Endocrinology* 81:1407-1409.
191. **Kaplan D.R., Morrison D.K., Wong G., McCormick F., Williams L.T. (1990).** PDGF  $\beta$ -receptor stimulates tyrosine phosphorylation of GAP and association of GAP with a signaling complex. *Cell* 61:125-133.
192. **Karsch F.J., Bittman E.L., Foster D.L., Goodman R.L., Legan S.J., Robinson J.E. (1984).** Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog.Horm.Res.* 40:185-232.
193. **Kasuga M., Kahn C.R., Hedo J.A., Van Obberghen E., Yamada K.M. (1978).** Insulin-induced receptor loss in cultured human lymphocytes is due to accelerated receptor degradation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78:6917-6921.
194. **Kasuga M., Karlsson F.A., Kahn C.R. (1982).** Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 215:185-187.
195. **Katz Y., Armstrong D.T. (1976).** Inhibition of ovarian estradiol-17 $\beta$  secretion by luteinizing hormone in prepubertal, pregnant mare serum-treated rats. *Endocrinology* 99:1442-1447.
196. **Kazlauskas A., Cooper J.A. (1989).** Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. *Cell* 58:1121-1133.

197. **Kazlauskas A., Cooper J.A. (1990).** Phosphorylation of the PDGF receptor  $\beta$ -subunit creates a tight binding site for phosphatidylinositol 3 kinase. *EMBO J.* 9:3279-3286.
198. **Kazlauskas A., Ellis C., Pawson T., Cooper J.A. (1990).** Binding of GAP to activated PDGF receptors. *Science* 247:1578-1581.
199. **Keller S.R., Kitagawa K., Aebersold R., Lienhard G.E., Garner C.W. (1991).** Isolation and characterization of the 160,000 Da phosphotyrosyl protein, a putative participant in insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 266:12817-12820.
200. **Kellogg M.P. (1941).** The development of the periovarial sac in the white rat. *Anat. Rec.* 79:465-477.
201. **Keyes P.L., Gadsby J.E., Yuh K.-C.M., Bill C.H. (1983).** The corpus luteum. *Int. Rev. Physiol.* 27:57-97.
202. **Keyes P.L., Wiltbank M.C. (1988).** Endocrine regulation of the corpus luteum. *Annu. Rev. Physiol.* 50:465-482.
203. **Khan M.I., Rosberg S., Lahav M., Lamprecht S.A., Selstam G., Herlitz H.V., Ahrén K.E.B. (1979).** Studies on the mechanism of action of the inhibitory effect of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  on cyclic AMP accumulation in rat corpora lutea of various ages. *Biol. Reprod.* 21:1175-1183.
204. **Kimura T. (1969).** Effects of hypophysectomy and ACTH administration on the level of adrenal cholesterol side-chain desmolase. *Endocrinology* 85:492-499.

205. **Kirchick H.J., Birnbaumer L. (1983).** Luteal adenylyl cyclase does not develop sensitivity to desensitization by human chorionic gonadotropin in the absence of nonluteal ovarian tissue. *Endocrinology* 113:2052-2058.
206. **Kirchik H., Keyes P.L., Frye B.E. (1979).** An explanation for anovulation in immature alloxan-diabetic rats treated with pregnant mare serum gonadotropin: reduced pituitary response to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 105:1343-1349.
207. **Knobil E. (1974).** On the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Recent Prog.Horm.Res.* 30:1-46.
208. **Kobayashi M., Olefsky J.M. (1979).** Effects of streptozotocin-induced diabetes on insulin binding, glucose transport, and intracellular glucose metabolism in isolated rat adipocytes. *Diabetes* 28:87-95.
209. **Koch C.A., Anderson D., Moran M.F., Ellis C., Pawson T. (1991).** SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252:668-674.
210. **Koritz S.B. (1967).** On the regulation of pregnenolone synthesis. p. 27-48. En: McKerns K.M. (ed.). *Functions of the adrenal cortex.* Appleton-Century-Crofts, New York.
211. **Koritz S.B., Péron F.G. (1958).** Studies on the mode of action of the adrenocorticotropic hormone. *J.Biol.Chem.* 230:343-352.
212. **Krebs E.G., Beavo J.A. (1979).** Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu.Rev.Biochem.* 48:923-959.

213. **Kuo J.F., Greengard P. (1969).** Cyclic nucleotide-dependent protein kinase. IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 64:1349-1353.
214. **Kypta R.M., Goldberg Y., Ulug E.T., Courtneidge S.A. (1990).** Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Cell* 62:481-492.
215. **Kyriakis J.M., App H., Zhang X-F., Banerjee P., Brautigan D.L., Rapp U.R., Avruch J. (1992).** Raf-1 activates MAP kinase kinase. *Nature* 358:417-421.
216. **Ladenheim R.G., Tesone M., Charreau E.H. (1984).** Insulin action and characterization of insulin receptors in rat luteal cells. *Endocrinology* 115:752-756.
217. **Laemmli U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680-688.
218. **Lakkakorpi J.T., Pietilä E.M., Aatsinki J.T., Rajaniemi H.J. (1993).** Human chorionic gonadotrophin (CG)-induced down-regulation of the rat luteal LH/CG receptor results in part from the down-regulation of its synthesis, involving increased alternative processing of the primary transcript. *J.Mol.Endocrinol.* 10:153-162.
219. **Lamphere L., Lienhard G.E. (1992).** Components of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor-I in muscle myoblasts and myotubes. *Endocrinology* 131:2196-2202.

220. **Lamprecht S.A., Herlitz H.V., Ahrén K.E.B. (1975).** Induction by  $\text{PGF}_{2\alpha}$  of 20-hydroxy-steroid dehydrogenase in first generation corpora lutea of rat. *Mol.Cell.Endocrinol.* 3:273-282.
221. **Lane T.A., Chen T.T. (1991).** Heterologous down-modulation of luteinizing hormone receptors by prolactin: a flow cytometry study. *Endocrinology* 128:1833-1840.
222. **LaPolt P.S., Oikawa M., Jia X-C., Dargan C., Hsueh A.J.W. (1990).** Gonadotropin-induced up- and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and luteinization. *Endocrinology* 126:3277-3279.
223. **Lavan B.E., Kuhné M.R., Garner C.W., Anderson D., Reedijk M., Pawson T., Lienhard G.E. (1992).** The association of insulin-elicited phosphotyrosine proteins with *src* homology 2 domains. *J.Biol.Chem.* 267:11631-11636.
224. **Lavan B.E., Lienhard G.E. (1993).** The insulin-elicited 60-kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. *J.Biol.Chem.* 268:5921-5928.
225. **Lawrence A.M., Contopoulos A.N. (1960).** Reproduction performance in the alloxan diabetic female rat. *Acta Endocrinol.(Copenh.)* 33:175-184.
226. **LeMaire W.J., Leidner R., Marsh J.M. (1975).** Pre and post ovulatory changes in the concentrations of prostaglandins in rat Graafian follicles. *Prostaglandins* 9:221-229.
227. **LeMaire W.J., Marsh J.M. (1975).** Interrelationships between prostaglandins, cyclic AMP and steroids in ovulation. *J.Reprod.Fertil.* 22 (Supl.):53-74.

228. **Levy J.E., Weinberg T. (1949).** Pregnancy in alloxan diabetic rats. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 72:658-662.
229. **Lieberman S., Greenfield N.J., Wolfson A. (1984).** A heuristic proposal for understanding steroidogenic processes. *Endocr.Rev.* 5:128.
230. **Lindan O., Morgans M.E. (1949).** Alloxan diabetes and pregnancy: a long-term observation. *J.Endocrinol.* 6:463-469.
231. **Ling N., Ying S.-Y., Ueno N., Shimasaki S., Esch F., Hotta M., Guillemin R. (1986).** Pituitary FSH is released by a heterodimer of the  $\beta$  subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321:779-782.
232. **Lipner H. (1973).** Mechanism of mammalian ovulation. p. 409-437. En: Greep R.O., Astwood E.B. (eds.). *Handbook of Physiology. Section 7: Endocrinology.* American Physiological Society, Washington D.C..
233. **Liu F.T.Y., Lin H.S., Johnson D.C. (1972).** Serum follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and the ovarian response to exogenous gonadotropins in alloxan-diabetic immature female rats. *Endocrinology* 91:1172-1179.
234. **Londesborough J. (1976).** Quantitative estimation of 3'-5' cyclic AMP phosphodiesterase using anion exchange resin in a batch process. *Anal.Biochem.* 71:623-628.
235. **Loosfelt H., Misrahi M., Atger M., Salesse R., Thi M., Jolivet A., Guiochon-Mantel A., Sar S., Jallal B., Garnier J., Milgrom E. (1989).** Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science* 245:525-528.

236. **Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275.
237. **Lu D.L., Peegel H., Mosier S.M., Menon K.M.J. (1993).** Loss of lutropin/human chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid during ligand-induced down-regulation occurs post transcriptionally. *Endocrinology* 132:235-240.
238. **Maciag T. (1984).** Angiogenesis. p. 167-182. En: Spaet T.H. (ed.). *Progress in Hemostasis and Thrombosis.* Grune & Stratton, Orlando.
239. **Magoffin D.A., Kurtz K.M., Erickson G.F. (1990).** Insulin-like growth factor-I selectively stimulates cholesterol side-chain cleavage expression in ovarian theca-interstitial cells. *Mol.Endocrinol.* 4:489-496.
240. **Makino H., Osegawa M., Kanatsuka A., Suzuki T. (1983).** Increased sensitivity of insulin-sensitive phosphodiesterase to insulin in fat cells from streptozotocin diabetic rats. *Endocrinology* 113:646-650.
241. **Malbon C.C., Fain J.N. (1977).** Insulin stimulation of particulate, low Km adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity in fat cells of the obese-hyperglycemic (ob/ob) mouse. *J.Cyclic.Nucleotide Res.* 3:315-319.
242. **Manganiello V., Vaughan M. (1972).** Prostaglandin E1 effects on adenosine 3':5'-cyclic monophosphate concentration and phosphodiesterase activity in fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 69:269-273.
243. **Maratos-Flier E., Kao C.Y., Verdin E.M., King G.L. (1987).** Receptor-mediated vectorial transcytosis of epidermal growth factor by Madin-Darby canine kidney cells. *J.Cell.Biol.* 105:1595-1601.

244. **Marble A. (1971).** Current concepts of diabetes. p. 1-9. En: Marble A., White P., Bradley R.F., Krall L.P. (eds.). *Joslin's Diabetes Mellitus*. Lea & Febiger, Philadelphia.
245. **March C.M., Goebelsmann U., Nakamura R.M., Mishell D.R.Jr. (1979).** Roles of estradiol and progesterone in eliciting the midcycle luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone surges. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 49:507-513.
246. **Marsh J. (1975).** The role of cAMP in gonadal function. *Adv.Cyclic Nucleotide Res.* 6:137-199.
247. **Marx J.L. (1984).** Diabetes. A possible autoimmune disease. *Science* 225:1381-1383.
248. **Mason N.R., Marsh J.M., Savard K. (1962).** An action of gonadotropin in vitro. *J.Biol.Chem.* 237:1801-1806.
249. **Matsuda M., Mayer B.J., Fukui Y., Hanafusa H. (1990).** Binding of transforming protein, P47<sub>gag-crk</sub>, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science* 248:1537-1539.
250. **McClain D.A., Maegawa H., Lee J., Dull T.J., Ullrich A., Olefsky J.M. (1987).** A mutant insulin receptor with defective tyrosine kinase displays no biological activity and does not undergo endocytosis. *J.Biol.Chem.* 262:14663-14671.
251. **McFarland K.C., Sprengel R., Phillips H.S., Köhler M., Roseblit N., Nikolics K., Segaloff D.L., Seeburg P.H. (1989).** Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245:494-499.



252. **McNatty K.P. (1978).** Follicular fluid. p. 215-259. En: Jones R.E. (ed.). The vertebrate ovary. Plenum Press, New York.
253. **McNatty K.P., Hunter W.M., McNeilly A.S., Sawers R.S. (1975).** Changes in the concentration of pituitary and steroid hormones in the follicular fluid of human Graafian follicles throughout the menstrual cycle. *J.Endocrinol.* 64:555-571.
254. **McNatty K.P., Makris A., DeGrazia C., Osathanondh R., Ryan K.J. (1979).** The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 49:687-699.
255. **McNatty K.P., Makris A., DeGrazia C., Osathanondh R., Ryan K.J. (1980).** Steroidogenesis by recombined follicular cells from the human ovary in vitro. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 51:1286-1292.
256. **McNatty K.P., Makris A., Osathanondh R., Ryan K.J. (1980).** Effects of luteinizing hormone on steroidogenesis by thecal tissue from human ovarian follicles in vitro. *Steroids* 36:53-63.
257. **McNatty K.P., Makris A., Reinhold V.N., DeGrazia C., Osathanondh R., Ryan K.J. (1979).** Metabolism of androstenedione by human ovarian tissues in vitro with particular reference to reductase and aromatase activity. *Steroids* 34:429-443.
258. **McNatty K.P., Smith D.M., Makris A., Osathanondh R., Ryan K.J. (1979).** The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 49:851-860.

259. **Meisenhelder J., Suh P.G., Rhee S.G., Hunter T. (1989).** Phospholipase C $\gamma$  is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell* 57:1109-1122.
260. **Mendelson C., Dufau M.L., Catt K.J. (1975).** Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells. *J.Biol.Chem.* 250:8818-8823.
261. **Minegishi T., Nakamura K., Takakura Y., Miyamoto K., Hasegawa Y., Ibuki Y., Igarashi M. (1990).** Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 172:1049-1054.
262. **Molinolo A.A., Lanari C., Charreau E.H., Sanjuan N., Dosne Pasqualini C. (1987).** Mouse mammary tumors induced by medroxy-progesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J.Natl.Cancer.Inst.* 79:1341-1350.
263. **Moller D.E., Yokota A., White M.F., Pazianos A.G., Flier J.S. (1990).** A naturally occurring mutation of insulin receptor alanine 1134 impairs tyrosine kinase function and is associated with dominantly inherited insulin resistance. *J.Biol.Chem.* 265:14979-14985.
264. **Molloy C.J., Bottaro D.P., Fleming T.P., Marshall M.S., Gibbs J.B., Aaronson S.A. (1991).** PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating protein. *Nature* 342:711-714.
265. **Mondschein J.S., Schomberg D.W. (1981).** Growth factors modulate gonadotropin receptor induction in granulosa cell cultures. *Science* 211:1179-1180.

266. **Mondschein J.S., Schomberg D.W. (1981).** Platelet-derived growth factor enhances granulosa cell luteinizing hormone receptor induction by follicle-stimulating hormone and serum. *Endocrinology* 109:325.
267. **Moodie S.A., Willumsen B.M., Weber M.J., Wolfman A. (1993).** Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260:1658-1661.
268. **Moon Y.S., Dorrington J.H., Armstrong D.T. (1975).** Stimulatory action of follicle-stimulating hormone on estradiol -17 $\beta$  secretion by hypophysectomized rat ovaries in organ culture. *Endocrinology* 97:244-247.
269. **Moon Y.S., Tsang B.K., Simpson C., Armstrong D.T. (1978).** 17 $\beta$ -Estradiol biosynthesis in cultured granulosa and thecal cells of human ovarian follicles: stimulation by follicle-stimulating hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 47:263-267.
270. **Mordes J.P., Rossini A.A. (1981).** Animal models of diabetes. *Am.J.Med.* 70:353-360.
271. **Morgan D.O., Edman J.C., Standring D.N., Fried V.A., Smith M.C., Roth R.A., Rutter W.J. (1987).** Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329:301-307.
272. **Morishige W.K., Rothchild I. (1974).** Temporal aspects of the regulation of corpus luteum function by luteinizing hormone, prolactin and placental luteotrophin during the first half of pregnancy in the rat. *Endocrinology* 95:260-274.
273. **Morrison D.K., Kaplan D.R., Escobedo J.A., Rapp U.R., Roberts T.M., Williams L.T. (1989).** Direct activation of the serine/threonine kinase activity of Raf-1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF  $\beta$ -receptor. *Cell* 58:649-657.

274. **Morrison D.K., Kaplan D.R., Rapp U.R., Roberts T.M. (1988).** Signal transduction from membrane to cytoplasm: Growth factors and membrane-bound oncogene products increase Raf-1 phosphorylation and associated protein kinase activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:8855-8859.
275. **Morrison D.K., Kaplan D.R., Rhee S.G., Williams L.T. (1990).** Platelet-derived growth factor (PDGF)-receptor-dependent association of phospholipase C $\gamma$  with the PDGF receptor signaling complex. *Mol.Cell.Biol.* 10:2359-2366.
276. **Mossman H.W., Duke K.L. (1973).** Some comparative aspects of the mammalian ovary. p. 389-402. En: Greep R.O., Astwood E.B. (eds.). *Handbook of Physiology.* American Physiological Society, Washington, D.C..
277. **Mukerjee S.P., Lynn W.S. (1977).** Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in adipocyte plasma membranes and its activation by insulin. *Arch.Biochem.Biophys.* 184:69-76.
278. **Murdoch W.J., Dunn T.G. (1982).** Alterations in follicular steroid hormone during the preovulatory period in the ewe. *Biol.Reprod.* 24:1171-1181.
279. **Murphy L.J., Bell G.I., Friesen H.G. (1987).** Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120:1279-1282.
280. **Myers Jr M.G., Backer J.M., Sun X.J., Shoelson S., Hu P., Schlessinger J., Yoakim M., Schaffhausen B., White M.F. (1992).** IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:10350-10354.

281. **Myers M.G., Jr., White M.F. (1993).** The new elements of insulin signaling: Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. *Diabetes* 42:643-650.
282. **Myers M.G.Jr., Backer J.M., Siddle K., White M.F. (1991).** The insulin receptor functions normally in Chinese hamster ovary cells after truncation of the C-terminus. *J.Biol.Chem.* 266:10616-10623.
283. **Nett T.M., McClellan M.C., Niswender G.D. (1976).** Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology. *Biol.Reprod.* 15:66-78.
284. **Neville A.M., Engel L.L. (1968).** Inhibition of steroid  $\Delta 5$ -isomerase of the bovine adrenal gland by substrate analogues. *Endocrinology* 83:873-876.
285. **Nielson M.H., Warren J.C. (1965).** TPNH generation in the human ovary. *Acta Endocrinol.(Copenh.)* 49:58-64.
286. **Nilsson L., Hillensjo T., Ekholm C. (1977).** Pre-ovulatory changes in rat follicular cyclic AMP and sensitivity to gonadotrophins. *Acta Endocrinol.(Copenh.)* 86:384-393.
287. **Nimmo H.G., Cohen P. (1977).** Hormonal control of protein phosphorylation. *Adv.Cyclic Nucleotide Res.* 8:145-266.
288. **Nimrod A., Erickson G.F., Ryan K.J. (1976).** A specific FSH receptor in rat granulosa cells: properties of binding in vitro. *Endocrinology* 98:56-64.
289. **Nishida E., Gotoh Y. (1993).** The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem.Sci.* 18:128-131.

290. **Nishimoto I. (1993).** The IGF-II receptor system: A G protein-linked mechanism. *Mol.Reprod.Dev.* 35:398-407.
291. **Nishiyama M., Wands J.R. (1992).** Cloning and increased expression of an insulin receptor substrate-1-like gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 183:280-285.
292. **Niswender G.D., Nett T.M. (1994).** The corpus luteum and its control in infraprimate species. p. 781-816. En: Knobil E., Neill J.D. (eds.). *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York.
293. **Niswender G.D., Reimers T.J., Diekman M.A., Nett T.M. (1976).** Blood flow: a mediator of ovarian function. *Biol.Reprod.* 14:64-81.
294. **Niswender G.D., Schwall R.H., Fitz T.A., Farin C.E., Sawyer H.R. (1985).** Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. *Recent Prog.Horm.Res.* 41:101-142.
295. **O'Hara A., Mori T., Taii S., Ban C., Narimoto K. (1987).** Functional differentiation in steroidogenesis of two types of luteal cells isolated from mature human corpora lutea of the menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 65:1192-1200.
296. **Obermaier-Kusser B., White M.F., Pongratz D.E., Su Z., Ermel B., Muhlbacher C., Haring H.U. (1989).** A defective intramolecular autoactivation cascade may cause the reduced kinase activity of the skeletal muscle insulin receptor from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Biol.Chem.* 264:9497-9504.
297. **Odawara M., Kadowaki T., Yamamoto R., Shibasaki Y., Tobe K., Accili D., Bevins C., Mikami Y., Matsuura N., Akanuma Y., Takaku F., Taylor S.I.,**

- Kasuga M. (1989).** Human diabetes associated with a mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. *Science* 245:66-68.
- 298.**Okamura H., Virutamasen P., Wright K.H., Wallach E.E. (1972).** Ovarian smooth muscles in the human being, rabbit and cat: histochemical and electron microscopic study. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 112:183-191.
- 299.**Oliver J.E., Aitman T.J., Powell J.F., Wilson C.A., Clayton R.N. (1989).** Insulin-like growth factor I gene expression in rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology* 124:2671-2679.
- 300.**Olsson J.H., Carlsson B., Hillensjo T. (1990).** Effect of insulin-like growth factor I on deoxyribonucleic acid synthesis in cultured human granulosa cells. *Fertil.Steril.* 54:1052-1057.
- 301.**Paavola L.G. (1979).** The corpus luteum of the guinea pig. IV. Fine structure of macrophages during pregnancy and postpartum luteolysis and the phagocytosis of luteal cells. *Am.J.Anat.* 154:337-364.
- 302.**Panayotou G., Waterfield M.D. (1992).** Phosphatidylinositol 3-kinase: A key enzyme in diverse signalling processes. *TrendsCellBiol.* 2:358-360.
- 303.**Parmer T.G., Roberts C.T.Jr., LeRoith D., Adashi E.Y., Khan I., Solan N., Nelson S., Zilberstein M., Gibori G. (1991).** Expression, action, and steroidal regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in the rat corpus luteum: their differential role in the two cell populations forming the corpus luteum. *Endocrinology* 129:2924-2932.

304. **Patwardhan V.V., Lanthier A. (1976).** Effect of an ovulatory dose of luteinizing hormone on the concentration of oestrone, oestradiol and progesterone in the rabbit ovarian follicles. *Acta Endocrinol.(Copenh.)* 82:792-800.
305. **Pawson T., Gish G.D. (1992).** SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 71:359-362.
306. **Peavy D.E., Edmondson J.W., Duckworth W.C. (1984).** Selective effects of inhibitors of hormone processing on insulin action in isolated hepatocytes. *Endocrinology* 114:753-760.
307. **Pelicci G., Lanfrancone L., Grignani F., McGlade J., Nicoletti F., Pawson T., Pelicci P.G. (1992).** A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70:93-104.
308. **Pepe G.J., Rothchild I. (1974).** A comparative study of serum progesterone levels in pregnancy and in various types of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 95:275-279.
309. **Perlman R., Bottaro D., White M.F., Kahn C.R. (1989).** Conformational changes in the  $\alpha$ -subunits and  $\beta$ -subunits of the insulin receptor identified by anti-peptide antibodies. *J.Biol.Chem.* 264:8946-8950.
310. **Peters H., Byskov A.G., Faber M. (1973).** Intraovarian regulation of follicle growth in the immature mouse. p. 20-23. En: Peters H. (ed.). *The development and maturation of the ovary and its functions.* Excerpta Medica, Amsterdam.
311. **Peters H., Byskov A.G., Himelstein-Braw R., Faber M. (1975).** Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J.Reprod.Fertil.* 45:559-566.



312. **Peters H., McNatty K.P. (1980).** Ovulation. p. 75-79. En: Peters H., McNatty K.P. (eds.). The ovary. Granada Publishing, London.
313. **Pinget M., Krummel Y., Gondar R., Dorner M. (1979).** Incidence de la maladie diabétique sur l'âge de survenue des premières règles. *Nouv.Presse Méd.* 44:3664-3668.
314. **Poretsky L. (1991).** On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states. *Endocr.Rev.* 12:3-13.
315. **Poretsky L., Glover B., Laumas V., Kalin M., Dunaif A. (1988).** The effects of experimental hyperinsulinemia on steroid secretion, ovarian [<sup>125</sup>I]insulin binding, and ovarian [<sup>125</sup>I]insulin-like growth-factor I binding in the rat. *Endocrinology* 122:581-585.
316. **Poretsky L., Kalin M.F. (1987).** The gonadotropic function of insulin. *Endocr.Rev.* 8:132-141.
317. **Poretsky L., Smith D., Seibel M., Pazianos A., Moses A.C., Flier J.S. (1984).** Specific insulin binding sites in human ovary. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 59:809-813.
318. **Potau N., Bailey A.C., Roach E., Williams J.A., Goldfine I.D. (1984).** Methylamine and monensin do not block insulin internalization but do influence the intracellular distribution and action of insulin in pancreatic acini from diabetic mice. *Endocrinology* 115:205-213.
319. **Randle P.J., Garland P.B., Hales C.N., Newsholme E.A., Denton R.M., Pogson C.I. (1966).** Interactions of metabolism and the physiological role of insulin. *Recent Prog.Horm.Res.* 22:1-48.

320. **Rao C.V., Estergreen V.L., Carinan F.R., Moss G.E., Frandle K.A. (1976).** Receptors for prostaglandin (PGF<sub>2α</sub>) and human choriogonadotropin (hCG) in cell membranes of bovine corpora lutea (CL) throughout estrous cycle. Vth International Congress of Endocrinology 322.(Abstract)
321. **Rees-Jones R.W., Hedo J.A., Zick Y., Roth J. (1983).** Insulin-stimulated phosphorylation of the insulin receptor precursor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 16:417-422.
322. **Rein M.S., Schomberg D.W. (1982).** Characterization of insulin receptors on porcine granulosa cells. *Biol.Reprod.* 26 (Suppl. 1):113A.
323. **Rerup C.C. (1970).** Drugs producing diabetes through damage of the insulin secretion cells. *Pharmacol.Rev.* 22:485-518.
324. **Richards J.S. (1979).** Hormonal control of ovarian follicular development: a 1978 perspective. *Recent Prog.Horm.Res.* 35:343-373.
325. **Richards J.S. (1979).** Hormone regulation of hormone receptors in ovarian follicular development. p. 225-242. En: Midgley A.R., Sadler W.A. (eds.). *Ovarian follicular development.* Raven Press, New York.
326. **Richards J.S., Midgley A.R.Jr. (1976).** Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol.Reprod.* 14:82-94.
327. **Richards J.S., Williams J.L. (1976).** Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH). Regulation by LH and PRL. *Endocrinology* 99:1571-1581.

328. **Rinderknecht E., Humbel R.E. (1978).** The amino acid sequence of human insulin-like growth factor-I and its structural homology with proinsulin. *J.Biol.Chem.* 253:2769-2776.
329. **Rinderknecht E., Humbel R.E. (1978).** The primary structure of human insulin-like growth factor-II. *FEBS Lett.* 89:283-286.
330. **Rivier C., Rivier J., Vale W. (1986).** Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 234:205-208.
331. **Robinson A. (1918).** The formation, rupture and closure of ovarian follicles in ferrets and ferret-polecat-hybrids and some associated phenomena. *Trans.Roy.Soc.Edinb.* 52:302-362.
332. **Robinson J., Stevenson P.M. (1971).** Electron flow and cholesterol-side-chain cleavage in ovarian mitochondria. *Eur.J.Biochem.* 24:18-30.
333. **Rogers R.J., Waterman M.R., Simpson E.R. (1987).** Levels of messenger ribonucleic acid encoding cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450, 17 $\alpha$ -hydroxylase cytochrome P-450, adrenodoxin, and low density lipoprotein receptor in bovine follicles and corpora lutea throughout the ovarian cycle. *Mol.Endocrinol.* 1:274-279.
334. **Ronnett G.V., Knutson V.P., Kohanski R.A., Simpson T.L., Lane M.D. (1984).** Role of glycosylation in the processing of newly translated insulin proreceptor in 3T3-L1 adipocytes. *J.Biol.Chem.* 259:4566-4575.
335. **Rosenfeld R.G., Lamson G., Pham H., Oh Y.M., Canover C., DeLeon D., Donovan S.M., Ocrant I., Giudice L.C. (1990).** Insulin-like growth factor binding proteins. *Recent Prog.Horm.Res.* 46:99-163.

336. **Roth R.A. (1988).** Structure of the receptor for insulin-like growth factor II: the puzzle amplified. *Science* 239:1269-1271.
337. **Rothchild I. (1965).** Interrelations between progesterone and the ovary, pituitary, and central nervous system in the control of ovulation and the regulation of progesterone secretion. *Vitam.Horm.* 23:209-327.
338. **Rothchild I. (1981).** The regulation of the mammalian corpus luteum. *Recent Prog.Horm.Res.* 37:183-298.
339. **Rothchild I., Pepe G.J., Morishige W.K. (1974).** Factors affecting the dependency on LH in the regulation of corpus luteum progesterone secretion in the rat. *Endocrinology* 95:280-288.
340. **Rotwein P. (1991).** Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 5:3-18.
341. **Rozakis-Adcock M., McGlade J., Mbamalu G., Pelicci G., Daly R., Li W., Batzer A., Thomas S., Brugge J., Pelicci P.G., Schlessinger J., Pawson T. (1992).** Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360:689-692.
342. **Ruderman N.B., Kapeller R., White M.F. (1990).** Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:1411-1415.
343. **Ryle A.P., Sanger F., Smith L.F., Kital R. (1955).** The disulphide bonds of insulin. *Biochem.J.* 60:541-556.

344. **Sanders M.M., Midgley A.R. (1982).** Rat granulosa cell differentiation: an in vitro model. *Endocrinology* 111:614-624.
345. **Saragüeta P., Krimer A.R.D., Charreau E.H., Tesone M. (1989).** Insulin regulation of steroidogenic activity in rat culture luteal cells. *J. Steroid Biochem.* 32:393-397.
346. **Savard K., Marsh J.M., Howell D.S. (1963).** Progesterone biosynthesis in luteal tissue: role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and NADP-linked dehydrogenases. *Endocrinology* 73:554-563.
347. **Savion N., Liu G.M., Laherty R., Gospodarowicz D. (1981).** Factors controlling proliferation and progesterone production by bovine granulosa cells in serum-free medium. *Endocrinology* 109:409-420.
348. **Sawyer H.R., Abel J.H.Jr., McClellan M.C., Schmitz M., Niswender G.D. (1979).** Secretory granules and progesterone secretion by ovine corpora lutea in vitro. *Endocrinology* 104:476-486.
349. **Scatchard G. (1949).** The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660-672.
350. **Schams D., Koll R., Li C.H. (1987).** Insulin-like growth factor I stimulates oxytocin and progesterone production by bovine granulosa cells in culture. *J. Endocrinol.* 116:97-100.
351. **Schoffling K., Federlin K., Schmitt W., Pfeiffer E.F. (1967).** Histometric investigations on the testicular tissue of rats with alloxan diabetes and Chinese hamsters with spontaneous diabetes. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 54:335-346.

352. **Schomberg D.W., Coudert S.P., Short R.V. (1967).** Effects of bovine luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin on the bovine corpus luteum in vivo. *J.Reprod.Fertil.* 14:277-285.
353. **Schreiber J.R., Ross G.T. (1976).** Further characterization of a rat ovarian testosterone receptor with evidence for nuclear translocation. *Endocrinology* 99:590-596.
354. **Schulster D., Richardson M.C., Palfreyman J.W. (1974).** The role of protein synthesis in adrenocorticotropin action: effects of cycloheximide and puromycin on the steroidogenic response of isolated adrenocortical cells. *Mol.Cell.Endocrinol.* 2:17-29.
355. **Schwartz J.P., Passonneau J.V. (1974).** Cyclic AMP-mediated induction of the cyclic AMP phosphodiesterase of C-6 glioma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 71:3844-3848.
356. **Schwartz N.B. (1982).** Novel peptides in ovarian follicular fluid: implications for contraceptive development. p. 1-10. En: Zatzuchni G.I. (ed.). *Research frontiers in fertility regulation.* Northwestern University, Chicago.
357. **Sen K., Azhar S., Menon K.M.J. (1979).** Receptor-mediated gonadotropin action in the ovary. Desensitization of gonadotropin binding sites, activation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase(s), and regulation of steroidogenesis in the ovary. *J.Biol.Chem.* 254:5664-5671.
358. **Senft G., Schultz G., Munske K., Hoffmann M. (1968).** Influence of insulin on cyclic 3',5'-AMP phosphodiesterase activity in liver, skeletal muscle, adipose tissue, and kidney. *Diabetologia* 4:322-329.

359. **Sheldrick E.L., Flint A.P.F. (1983).** Regression of the corpora lutea in sheep in response to cloprostenol is not affected by loss of luteal oxytocin after hysterectomy. *J.Reprod.Fertil.* 68:155-160.
360. **Shipley E.G., Danley K.S. (1947).** Pituitary and gonadal dysfunction in experimental diabetes. *Am.J.Physiol.* 150:84-94.
361. **Shoupe D., Lobo R.A. (1984).** The influence of androgens on insulin resistance. *Fertil.Steril.* 41:385-388.
362. **Silvia W.J., Fitz T.A., Mayan M.H., Niswender G.D. (1984).** Cellular and molecular mechanisms involved in luteolysis and maternal recognition of pregnancy in the ewe. *Anim.Reprod.Sci.* 7:57-74.
363. **Simmons K.R., Caffrey J.L., Phillips J.L., Abel J.H.Jr., Niswender G.D. (1976).** A simple method for preparing suspensions of luteal cells. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 152:366-371.
364. **Simpson E.R., McCarthy J.L., Peterson F.A. (1978).** Evidence that the cycloheximide-sensitive site of adrenocorticotrophic hormone action is in the mitochondrion. Changes in pregnenolone formation, cholesterol content, and the electron paramagnetic resonance spectra of cytochrome P-450. *J.Biol.Chem.* 253:3135-3139.
365. **Simpson E.R., Waterman M.R. (1988).** Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Ann.Rev.Physiol.* 50:427-440.
366. **Sinden J.A., Longwell B.B. (1949).** Effect of alloxan diabetes on fertility and gestation in the rat. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 70:607-610.

367. **Skolnik E.Y., Batzer A., Li N., Lee C.-H., Lowenstein E., Mohammadi M., Margolis B., Schlessinger J. (1993).** The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 260:1953-1955.
368. **Skyler J.S., Cahill G.F.Jr. (1981).** Diabetes mellitus: progress and directions. *Am.J.Med.* 70:101-104.
369. **Smith M.S., Freeman M.E., Neill J.D. (1975).** The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226.
370. **Sodoyez J.C., Sodoyez-Goffaux F., Treves S., Kahn C.R., von Frenckell R. (1984).** In vivo imaging and quantitative analysis of insulin-receptor interaction in lean and obese Zucker rats. *Diabetologia* 26:229-233.
371. **Solomon S.S. (1975).** Effect of insulin and lipolytic hormones on cyclic AMP phosphodiesterase activity in normal and diabetic rat adipose tissue. *Endocrinology* 96:1366-1373.
372. **Solomons B., Gatenby J.W.B. (1924).** Notes on the formation, structure and physiology of the corpus luteum of man, the pig and the duck-billed platypus. *J.Obstet.Gynaec.Brit.Emp.* 31:580-594.
373. **Soodak L.K., Musicki B., Behrman H.R. (1988).** Selective amplification of luteinizing hormone by adenosine in rat luteal cells. *Endocrinology* 122:847-854.
374. **Soulairac A., Desclaux P. (1948).** Les modifications endocriniennes au cours du diabète alloxanique du rat. *Ann.d'Endocr.* 9:333.



375. **Steiner A.L., Pagliara A.S., Chase L.R., Kipnis D.M. (1972).** Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. II. Adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'- monophosphate in mammalian tissues and body fluids. *J.Biol.Chem.* 247:1114-1120.
376. **Stouffer R.L., Hodgen G.D. (1980).** Induction of luteal phase defects in rhesus monkeys by follicular fluid administration at the onset of the menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 51:669-671.
377. **Strauss III J.F., Schuler L.A., Rosenblum M.F., Tanaka T. (1981).** Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv.Lipid.Res.* 18:99-157.
378. **Strickland S., Beers W.H. (1976).** Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. *J.Biol.Chem.* 251:5694-5702.
379. **Strott C.A. (1977).** A pregnenolone-binding protein in soluble fraction of guinea pig adrenal cortex. *J.Biol.Chem.* 252:464-470.
380. **Stumpt P.K. (1969).** Metabolism of fatty acids. *Annu.Rev.Biochem.* 38:159-212.
381. **Suen K.-L., Bustelo X.R., Pawson T., Barbacid M. (1993).** Molecular cloning of the mouse *grb2* gene: Differential interaction of the Grb2 adaptor protein with epidermal growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol.Cell.Biol.* 13:5500-5512.
382. **Sun X.J., Miralpeix M., Myers M.G.Jr., Glasheen E.M., Backer J.M., Kahn C.R., White M.F. (1992).** Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *J.Biol.Chem.* 267:22662-22672.
383. **Sun X.J., Rothenberg P., Kahn C.R., Backer J.M., Araki E., Wilden P.A., Cahill D.A., Goldstein B.J., White M.F. (1991).** The structure of the insulin

receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352:73-77.

384. **Suter D.E., Fletcher P.W., Sluss P.M., Reichert L.E.Jr., Niswender G.D. (1980).** Alterations in the number of ovine luteal receptors for LH and progesterone secretion induced by homologous hormone. *Biol.Reprod.* 22:205-210.
385. **Talavera F., Menon K.M.J. (1991).** Studies on rat luteal cell response to insulin-like growth factor I (IGF-I): identification of a specific cell membrane receptor for IGF-I in the luteinized rat ovary. *Endocrinology* 129:1340-1346.
386. **Taylor S.I., Dons R.F., Hernandez E.R., Roth J., Gordon P. (1982).** Insulin resistance associated with androgen excess in women with auto-antibodies to the insulin receptor. *Ann.Intern.Med.* 97:851.
387. **Terasawa E., Rodriguez-Sierra J.F., Dierschke D.J., Bridson W.E., Goy R.W. (1980).** Positive feedback effect of progesterone on luteinizing hormone (LH) release in cyclic female rhesus monkeys: LH response occurs in two phases. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 51:1245-1250.
388. **Tesone M., Ladenheim R.G., Cheb-Terrab R., Chiauzzi V., Solano A., Podestá E., Charreau E.H. (1986).** Comparison between bioactive and immunoactive luteinizing hormone (LH) in ovariectomized streptozotocin-induced diabetic rats: response to LH-releasing hormone. *Endocrinology* 119:2412-2416.
389. **Tesone M., Ladenheim R.G., Oliveira-Filho R.M., Chiauzzi V.A., Foglia V.G., Charreau E.H. (1983).** Ovarian dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 174:123-130.
390. **Testard J., Castanier M., Feinstein M.-C.,Frydman R. (1982).** Pituitary and steroid hormones in the preovulatory follicle during spontaneous or stimulated

- cycles. p. 193-201. En: Rolland R., van Hall E.V., Hillier S.G., McNatty K.P., Schoemaker (eds.). Follicular maturation and ovulation. Excerpta Medica, Amsterdam.
391. **Téllez-Iñón M.T., Ladenheim R.G., Ulloa R., Charreau E.H., Tesone M. (1987).** Regulation by insulin of cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) from rat luteal cells. *Horm.Metabol.Res.* 19:249-252.
392. **Thompson W.J., Appleman M.M. (1971).** Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities in rat brain. *Biochemistry* 10:311-316.
393. **Toaff M.E., Schleyer H., Strauss J.F.III. (1982).** Metabolism of 25-hydroxycholesterol by rat luteal mitochondria and dispersed cells. *Endocrinology* 111:1785-1790.
394. **Trzeciak B. (1978).** The effects of diabetes mellitus on the incidence of abnormal genital bleeding in women. *Ginekol.Pol.* 49:119-123.
395. **Trzeciak W.H., Boyd G.S. (1974).** Activation of cholesteryl esterase in bovine adrenal cortex. *Eur.J.Biochem.* 46:201-207.
396. **Trzeciak W.H., Waterman M.R., Simpson E.R. (1986).** Synthesis of the cholesterol side-chain cleavage enzymes in cultured rat ovarian granulosa cells: induction by follicle-stimulating hormone and dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 119:323-330.
397. **Tsafri A., Lindner H.R., Zor U., Lamprecht S.A. (1972).** In-vitro induction of meiotic division in follicle-enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E<sub>2</sub>. *J.Reprod.Fertil.* 31:39-50.

398. **Tsang B.K., Armstrong D.T., Whitfield J.F. (1980).** Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 51:1407-1411.
399. **Ueda M., Robinson F.W., Smith M.M., Kono T. (1985).** Effects of monensin on insulin processing in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 260:3941-3946.
400. **Ueno N., Ling N., Ying S.-Y., Esch F., Shimasaki S., Guillemin R. (1987).** Isolation and partial characterization of follistatin, a novel Mr 35,000 monomeric protein which inhibits the release of follicle stimulating hormone. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:8282-8286.
401. **Ui M., Shimonaka M., Shimasaki S., Ling N. (1989).** An insulin-like growth factor binding protein in ovarian follicular fluid blocks follicle-stimulating hormone-stimulated steroid production by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 125:912-916.
402. **Ullrich A., Bell J.R., Chen E.Y., Herrera R., Petruzzelli L.M., Dull T.J., Gray A., Coussens L., Liao Y-C., Tsubokawa M., Mason A., Seeburg P.H., Grunfeld C., Rosen O.M., Ramachandran J. (1985).** Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313:756-761.
403. **Ullrich A., Gray A., Tam A.W., Yang-Feng T., Tsubokawa M., Collins C., Ramachandran J., Fujita-Yamaguchi Y. (1986).** Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 5:2503-2512.
404. **Ushiro H., Cohen S. (1980).** Identification of a phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J.Biol.Chem.* 255:8363-8365.

405. **Vale W., Rivier J., Vaughan J., McClintock R., Corrigan A., Woo W., Karr D., Spiess J. (1986).** Purification and characterization of an FSH-releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321:776-779.
406. **Van Aelst L., Barr M., Marcus S., Polverino A., Wigler M. (1993).** Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:6213-6217.
407. **Veldhuis J.D., Furlanetto R.W. (1985).** Trophic actions of human somatomedin-C/insulin-like growth factor I on ovarian cells: in vitro studies with swine granulosa cells. *Endocrinology* 116:1235-1242.
408. **Veldhuis J.D., Klase P.A., Strauss III J.F., Hammond J.M. (1982).** Facilitative interactions between estradiol and luteinizing hormone in the regulation of progesterone production by cultured swine granulosa cells: relation to cellular cholesterol metabolism. *Endocrinology* 111:441-447.
409. **Veldhuis J.D., Kolp L.A., Toaff M.E., Strauss III J.F., Demers L.M. (1983).** Mechanisms subserving the trophic actions of insulin on ovarian cells. In vitro studies using swine granulosa cells. *J.Clin.Invest.* 72:1046-1057.
410. **Veldhuis J.D., Rodgers R.J., Dee A., Simpson E.R. (1986).** The insulin-like growth factor, somatomedin-C, induces the synthesis of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin in ovarian cells. *J.Biol.Chem.* 261:2499-2502.
411. **Veldhuis J.D., Rodgers R.J., Furlanetto R.W., Azimi P., Juchter D., Garmey J. (1986).** Synergistic actions of estradiol and the insulin-like growth factor somatomedin-C on swine ovarian (granulosa) cells. *Endocrinology* 119:530-533.

412. **Virutamasen P., Wright K.H., Wallach E.E. (1972).** Effects of prostaglandins  $E_2$  and  $F_{2\alpha}$  on ovarian contractility in the rabbit. *Fertil.Steril.* 23:675-682.
413. **von Mering J., Minkowski O. (1890).** Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. *Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exptl.Pathol.Pharmakol.* 26:371-387.
414. **Waelbroeck M. (1979).** The pH dependence of insulin binding. A quantitative study. *J.Biol.Chem.* 257:8284-8291.
415. **Wang C., Hsueh A.J.W., Erickson G.F. (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.
416. **Warne P.H., Rodríguez Viciano P., Downward J. (1993).** Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364:352-355.
417. **Waterman M.R., Simpson E.R. (1985).** Regulation of the biosynthesis of cytochromes P-450 involved in steroid hormone synthesis. *Mol.Cell.Endocrinol.* 39:81-89.
418. **Wathes D.C., Swann R.W., Birkett S.D., Porter D.G., Pickering B.T. (1983).** Characterization of oxytocin, vasopressin, and neurophysin from the bovine corpus luteum. *Endocrinology* 113:693-698.
419. **Weiss T.J., Seamark R.F., McIntosh J.E.A., Moor R.M. (1976).** Cyclic AMP in sheep ovarian follicles: site of production and response to gonadotrophins. *J.Reprod.Fertil.* 46:347-353.

420. **White M.F., Kahn C.R. (1989).** The cascade of autophosphorylation in the  $\beta$ -subunit of the insulin receptor. *J.Cell.Biochem.* 39:429-441.
421. **White M.F., Shoelson S.E., Keutmann H., Kahn C.R. (1988).** A cascade of tyrosine autophosphorylation in the  $\beta$ -subunit activates the insulin receptor. *J.Biol.Chem.* 263:2969-2980.
422. **Williams M.T., Marsh J.M. (1978).** Estradiol inhibition of luteinizing hormone-stimulated progesterone synthesis in isolated bovine luteal cells. *Endocrinology* 103:1611-1618.
423. **Wiltbank M.C., Knickerbocker J.J., Niswender G.D. (1989).** Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. I. Phosphorylation activity and steroidogenic action in large and small ovine luteal cells. *Biol.Reprod.* 40:1194-1200.
424. **Wimsatt W.A., Waldo C.M. (1945).** The normal occurrence of a peritoneal opening in the bursa ovarii of the mouse. *Anat.Rec.* 93:47-57.
425. **Yamamoto T., Bishop R.W., Brown M.S., Goldstein J.L., Russell D.W. (1986).** Deletion in cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit. *Science* 232:1230-1237.
426. **Ying S.-Y. (1988).** Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr.Rev.* 9:267-293.
427. **Ying S.-Y., Becker A., Swanson G., Tan P., Ling N., Esch F., Ueno N., Shimasaki S., Guillemin R. (1987).** Follistatin specifically inhibits pituitary follicle stimulating hormone release in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 149:133-139.

428. **Yoshimi T., Strott C.A., Marshall J.R., Lipsett M.B. (1969).** Corpus luteum function in early pregnancy. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 29:225-230.
429. **Young J.R., Jaffe R.B. (1976).** Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. II. Effects of varying concentrations of estradiol. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 42:432-442.
430. **Younglai E.V. (1977).** Steroid production by isolated rabbit ovarian follicles: effects of luteinizing hormone from mating to implantation. *J.Endocrinol.* 73:59-65.
431. **Zelevnik A.J. (1981).** Premature elevation of systemic estradiol reduces serum levels of follicle-stimulating hormone and lengthens the follicular phase of the menstrual cycle in rhesus monkeys. *Endocrinology* 109:352-355.
432. **Zelevnik A.J., Midgley A.R., Reichert L.E.Jr. (1974).** Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 95:818-825.
433. **Zhang X-F., Settleman J., Kyriakis J.M., Takeuchi-Suzuki E., Elledge S.J., Marshall M.S., Bruder J.T., Rapp U.R., Avruch J. (1993).** Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 364:308-313.
434. **Zhiwen Z., Carson R.C., Herington A.D., Lee V.W.K., Burger H.G. (1987).** Follicle-stimulating hormone and somatomedin-C stimulate inhibin production by rat granulosa cells. *Endocrinology* 120:1633-1638.



435. Zlotkin T., Farkash Y., Orly J. (1986). Cell-specific expression of immunoreactive cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 119:2809-2820.

**FCE y N BIBLIOTEC.**