

# La Secreción de LH depende de la Proteína SNAP-25 sensible a GnRH

José Luis Quintanar Stephano <sup>1</sup>, Eva Salinas Miralles <sup>2</sup>  
Rosa María Chávez Morales <sup>3</sup> y Andrés Quintanar Stephano <sup>4</sup>

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han identificado una gran variedad de proteínas de membrana plasmática que participan en el fenómeno de secreción hormonal en varios tejidos endocrinos. La proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa de peso molecular (SNAP-25) fue originalmente identificada en la membrana presináptica del tejido nervioso, sin embargo posteriormente, se identificó en tejidos secretores como la adenohipófisis (Jacobsson y Meister 1996; Salinas y Quintanar 1999). Esta proteína funciona en asociación con la Sintaxina, otra proteína de la membrana plasmática y ambas interactúan con una tercera proteína de membrana pero vesicular, llamada sinaptobrevina, quienes al actuar conjuntamente, generan un acoplamiento y fusión de vesículas con la membrana plasmática, dando como resultando la liberación hormonal (Gerst 1999). Se ha demostrado que la SNAP-25 es crucial para la liberación de las hormonas prolactina (PRL) y adrenocorticotrófica (ACTH) en las líneas celulares hipofisarias GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> (Masumoto *et al.*, 1997) y ArT-20 (Aguado *et al.*, 1997). También se ha establecido que la expresión

de SNAP-25 está relacionada su concentración con la dinámica de secreción hormonal, como es en el caso de hipófisis de ratas tratadas con 17 $\beta$ -estradiol, donde se observaron niveles bajos de SNAP-25 y concentraciones elevadas de PRL (Majó *et al.*, 1999). También se ha reportado que la inmunoreactividad de SNAP-25 está incrementada en tejido con hipersecreción como prolactinomas humanos (Majó *et al.*, 1997). En previos experimentos hemos encontrado, que la disminución de las hormonas tiroideas tiroxina y triyodotironina causa un incremento importante en la expresión de SNAP-25 adenohipofisaria en ratas (Quintanar y Salinas 2002).

La hormona peptídica hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH) es la principal estimulante de los gonadotropos adenohipofisarios para la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), a través del mecanismo de apertura de canales de calcio y por tanto, incrementar el calcio intracelular y activar los procesos de fosforilación-defosforilación y finalmente inducir la exocitosis hormonal (Stojilkovic *et al.*, 1994).

En el presente trabajo se estudió el papel de SNAP-25 en la secreción de LH en células adenohipofisarias en cultivo y también si la GnRH podría regular la expresión de esta proteína tanto de células adenohipofisarias en cultivo (*in vitro*) como también en adenohipófisis de rata íntegra (*in vivo*).

<sup>1</sup> Dr. en Neurociencias. Prof.-Inv. de dedicación exclusiva del Depto. de Fisiología y Farmacología del Centro de Ciencias Básicas. UAA. Teléfono y Fax: (449) 9 10 84 23 E-mail: jlquinta@correo.uaa.mx

<sup>2</sup> Dra. en Medicina. Prof.-Inv. de tiempo completo del Depto. de Microbiología del Centro de Ciencias Básicas.UAA.

<sup>3</sup> Biól. participante del proyecto para acreditar el taller de investigación.

<sup>4</sup> Dr. en Fisiología. Prof.-Inv. de dedicación exclusiva del Depto. de Fisiología y Farmacología del Centro de Ciencias Básicas. UAA.

**MATERIALES Y MÉTODOS****Experimentos *in vitro***

**Cultivo de células adenohipofisarias.** Se utilizaron cuarenta ratas macho adultos de la cepa Wistar de 200-250 g. de peso corporal, mantenidas en condiciones controladas de temperatura y luz, y suministro de comida y agua *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados por inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico (50 mg/Kg i.p.) y se utilizaron como donadores de adenohipófisis. Los lóbulos anteriores fueron dispersados con 0.5% colagenasa y 0.17 % de hialuronidasa. Las células dispersadas fueron cultivadas con diferentes densidades en placas de cultivo costar y mantenidas en medio Eagle modificado con Dulbecco conteniendo 10% de suero fetal de ternera. Los cultivos se mantuvieron a 37° C bajo condiciones atmosféricas de 95 % de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas antes de ser usadas.

**Inmunocitoquímica por SNAP-25 en cultivos de células incubadas con GnRH.** La presencia de SNAP-25 fue estudiado por inmunocitoquímica usando células cultivadas a diferentes tiempos (4 ó 72 h y 100,000 células / placa) e incubadas con GnRH (100 nM). Las células se fijaron con formalina al 10 % por 1 hora y posteriormente las células se lavaron con 1% de albúmina de suero bovino y se incubaron a 4° C con una dilución de 1:100 del anticuerpo para SNAP-25 y el método de avidina-biotina-peroxidasa fue aplicado. El producto de la reacción se desarrolló con diaminobenzidina y el núcleo fue ligeramente contrastado con hematoxilina. Para los controles, las células fueron incubadas sin el anticuerpo primario o sin la inmunoglobulina G (IgG) no específica de conejo.

**Efecto del anticuerpo contra SNAP-25 sobre la secreción de LH en células permeabilizadas.** Tal como lo describieron Gutiérrez *et al.* (1995) respecto a la entrada y bloqueo de la SNAP-25 por el anticuerpo, durante el período de permeabilización con digitonina 20 µM por 10 minutos, las células adenohipofisarias fueron incubadas (5X10<sup>5</sup> células/placa) en presencia de anti-SNAP-25 o anti-SNAP-25 desnaturalizado (100° C/10 min.) como control. Después de este tratamiento, el medio se desechó y las células fueron tratadas por 10 minutos con el mismo método sin digitonina, con una concentración de 10 µM de Ca<sup>2+</sup> o ácido etileno-glicol-tetracético

(EGTA) (5mM) conteniendo los anticuerpos ensayados. En el sobrenadante se cuantificó la LH secretada empleando la técnica de ELISA.

**Expresión de SNAP-25 en células adenohipofisarias incubadas con GnRH.** Las células adenohipofisarias (5 X 10<sup>6</sup> células/placa) fueron incubadas con GnRH (100 nM) durante 4 ó 72 horas y la LH fue medida por ELISA en el sobrenadante. Las células fueron homogenizadas para electroforesis, corriéndose 100 µg de proteína por muestra. Después de la electroforesis, los geles fueron electrotransferidos a membranas de difluoruro de polivinil. Las membranas fueron tratadas con 3% de albúmina de suero bovino por una hora a temperatura ambiente e incubadas a 4° C con el anti-SNAP-25 monoclonal. Las membranas fueron incubadas por 2 horas con el anticuerpo secundario unido a fosfatasa-alcalina (dilución de 1:200,000) y el color fue desarrollado usando 5 bromo-4-cloro-3 indolil fosfato en tabletas de tetrazolium de nitro azul. El nivel de expresión fue cuantificada por densitometría, usando un sistema digital de imagen Kodak y los valores fueron expresados como intensidad media (M.I.) por 100 µg de proteína.

**Experimentos *in vivo***

**Efecto de la GnRH en la expresión de SNAP-25 en adenohipófisis de ratas castradas.** Ya que varias hormonas esteroideas inducen cambios en la expresión de SNAP-25 y por tanto evitar posible interferencia, se castraron 20 ratas macho de la cepa Wistar con peso de 250 g. Éstas se mantuvieron con alimento Purina estándar y con agua *ad libitum* bajo ciclos de 12 h luz: 12 h oscuridad. Quince días después de operadas las ratas fueron divididas en dos grupos: (1) Tratadas con GnRH (100 ng/dos veces/día por 5 días s.c.) y (2) Tratadas con NaCl (0.85 %) como controles. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación bajo anestesia con pentobarbital sódico (35 mg/Kg i.p.). Después de la extracción del lóbulo neurointermedio, las hipófisis anteriores fueron pesadas y usadas para inmunohistoquímica y análisis de Western blot.

**Análisis inmunohistoquímico.** Cinco adenohipófisis por grupo (Tratadas con GnRH y Controles) se fijaron en 10% de formalina, se deshidrataron en diferentes grados de etanol y se incluyeron en parafina. Consecutivamente se prepararon secciones de 5 µm de grosor. Para el análisis

inmunohistoquímico de SNAP-25 se utilizó el método avadina-biotina-peroxidasa.

**Análisis de Western Blot.** Cinco hipófisis por grupo fueron homogenizadas y fueron analizadas por Western blot y la cuantificación de SNAP-25 fue por densitometría. Los valores fueron expresados como Intensidad media (M.I.) por  $\mu\text{g}$  de proteína.

**Evaluación estadística.** Los datos son expresados como la media  $\pm$  SEM y el análisis de variancia fue analizada con la prueba de Tukey-Kramer. El nivel de diferencia significativa se consideró para  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### *Inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas*

Se encontró inmunorreactividad de SNAP-25 en células adenohipofisarias cultivadas por 4 y 72 h e incubadas con GnRH (100 nM). El marcaje fue evidente por su intensidad en la membrana plasmática (Fig. 1b). Resultados similares fueron

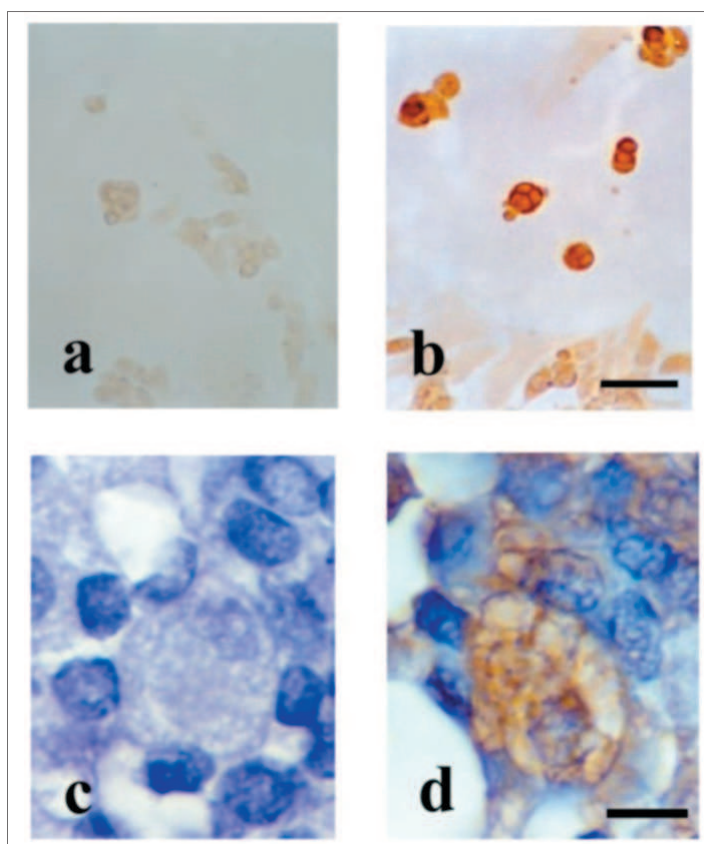
obtenidos en células adenohipofisarias de ratas castradas, donde la SNAP-25 estuvo presente en casi todas las células y en particular, la inmunorreactividad encontrada fue muy marcada en los gonadotropos definidos por su mayor tamaño y morfología (Fig. 1d).

### *Efecto de anticuerpos contra SNAP-25 sobre la secreción de LH en células permeabilizadas*

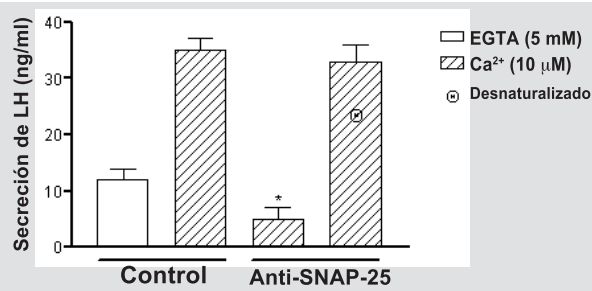
Las células permeabilizadas se incubaron con un anticuerpo contra SNAP-25 intacto o desnaturalizado para bloquear la proteína SNAP-25 y la secreción de LH bajo la estimulación de calcio. Los resultados mostraron que la secreción de LH inducida por la estimulación de calcio disminuyó significativamente (85%) después de la incubación con el anticuerpo contra SNAP-25. El anticuerpo desnaturalizado no tuvo efectos sobre la secreción de LH (Fig. 2). No se observaron cambios en la secreción basal de LH cuando las células fueron incubadas con anti-SNAP-25 más EGTA.

### *Expresión de SNAP-25 en células adenohipofisarias in vitro e in vivo tratadas con GnRH.*

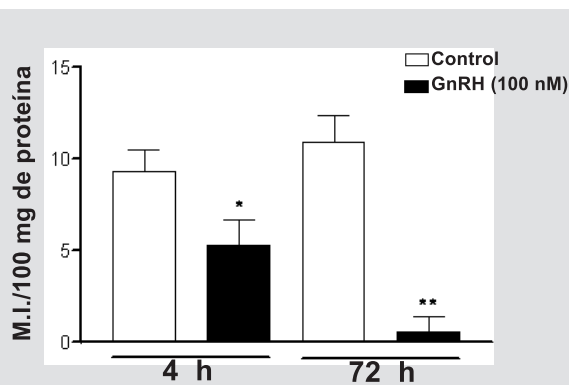
El análisis del Western Blot reveló los niveles de expresión de SNAP-25 en células adenohipofisarias *in vitro* incubadas con GnRH. La cuantificación densitométrica mostró que SNAP-25 disminuyó en un 50% y 90% a las 4 y 72 h de incubación con GnRH respectivamente (Fig. 3). La secreción de LH medida por ELISA, incrementó después de 4 y 72 h de estimulación con GnRH comparado con la secreción basal ( $2.0 \pm 0.1$  vs.  $4.2 \pm 0.3$  y  $5.1 \pm 0.2$  ng/ $\mu\text{l}$  respectivamente). Así mismo, en las adenohipófisis de ratas castradas, la administración de GnRH por 5 días redujo la expresión de SNAP-25 (de  $41.2 \pm 0.3$  a  $30.2 \pm 0.5$ ;  $p < 0.001$ ) (Figura 4).



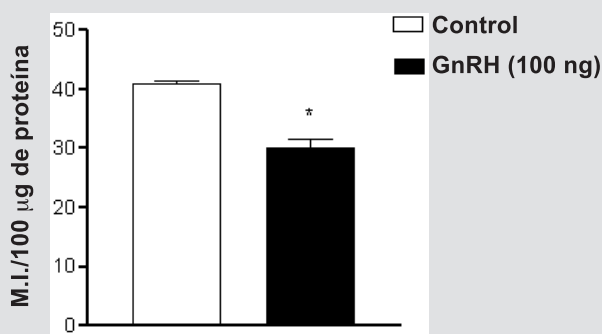
**Figura 1.-** Microfotografía de células adenohipofisarias en cultivo tratadas con GnRH (100 nM, 72 h) inmunoteñidas para SNAP-25. Control sin anticuerpo (a) y anti-SNAP-25 (b). Adenohipófisis de rata castrada tratada con GnRH (100 nM). Control sin anticuerpo (c) y anti-SNAP-25 (d). En a y b la barra equivale a  $50 \mu$  y en c y d la barra equivale a  $10 \mu$ .



**Figura 2.-** Secretión de LH por células adenohipofisarias permeabilizadas en cultivo ( $1 \times 10^5$  células/placa), incubadas con anticuerpos anti-SNAP-25. Unas estimuladas con calcio y otras incubadas solamente con el quelante EGTA. \*  $p < 0.001$  comparado con el Control estimulado con calcio.



**Figura 3.-** Análisis densitométrico del Western blot de SNAP-25 de células adenohipofisarias en cultivo incubadas con GnRH (100 nM) a las 4 y 72 horas. \*  $p < 0.01$  y \*\*  $p < 0.001$  respecto a su control.



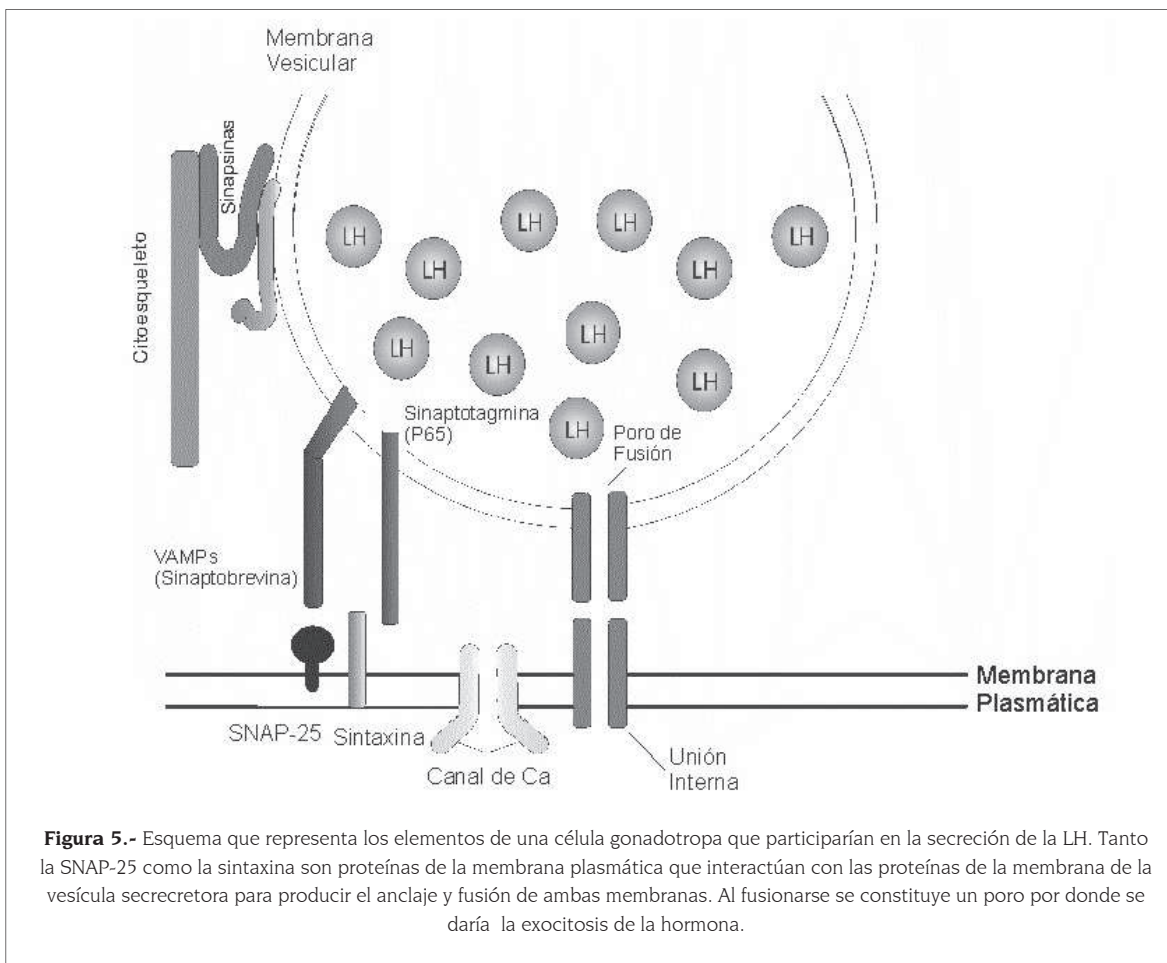
**Figura 4.-** Análisis densitométrico del Western blot de SNAP-25 de adenohipófisis de ratas castradas tratadas con GnRH (100 ng/dosis veces/día durante 5 días). \*  $p < 0.001$ .

## DISCUSIÓN

En años recientes, varias proteínas relacionadas con el mecanismo de la secreción hormonal han sido identificadas en la hipófisis de diferentes especies (Jacobsson y Meister 1996; Salinas y Quintanar 1999). La presencia de SNAP-25 en células gonadotrópicas ha sido descrita por Jacobsson y Meister (1996). En nuestro caso, encontramos resultados similares en los gonadotropos, que por sus características de tamaño y morfología, corresponden a las denominadas células de castración (gonadotropos modificados). Éstas últimas se originan, debido a una sobre-estimulación de la GnRH sobre los gonadotropos, ya que en ratas castradas su sistema de retroalimentación negativo, ha sido interrumpido por la ausencia de testosterona (castración). Nuestros resultados mostraron que SNAP-25 estuvo presente en células adenohipofisiales en cultivo y que la secreción de LH puede ser bloqueada por los anticuerpos contra SNAP-25 en células permeabilizadas. Se ha reportado que la introducción de un oligonucleótido antisentido de SNAP-25 dentro de una línea celular clonal hipofisaria, también inhibe la liberación de prolactina inducida por TRH (Mausmoto *et al.*, 1997). Estos hechos apoyan la idea de que estas proteínas juegan un papel crucial en la secreción hormonal. El modelo de participación de las proteínas de exocitosis se puede ver reflejado en la Figura 5. Es posible que otras proteínas estén involucradas en la exocitosis hormonal como lo sugirió Coorsen *et al.* (2003), así como también es posible que en nuestro modelo de célula permeabilizada incubada con anti-SNAP-25 y estimulada con  $\text{Ca}^{2+}$  algunas hormonas hipofisarias como la FSH, TSH, GH, etc., puedan, de igual manera, ser inhibidas.

Pocos factores son capaces de regular los niveles de SNAP-25 y han sido identificados en tejidos endocrinos hasta ahora, estos incluyen, ciertas hormonas, mensajeros intracelulares y despolarización (Hepp y Langley, 2001). En nuestro estudio, la administración de GnRH indujo una disminución significativa de la expresión de SNAP-25 en células adenohipofisarias en cultivo y en adenohipófisis de ratas castradas. Es factible que la administración de GnRH reduzca los niveles de mRNA para SNAP-25 igual que como ocurre en glándulas hipofisarias de ratas ovariectomizadas tratadas con estrógeno (Jacobsson *et al.*, 1998). Probablemente también sea que, la baja regulación de GnRH se dé por un incremento en la degradación de SNAP-25.





**Figura 5.-** Esquema que representa los elementos de una célula gonadotropa que participarían en la secreción de la LH. Tanto la SNAP-25 como la sintaxina son proteínas de la membrana plasmática que interactúan con las proteínas de la membrana de la vesícula secretora para producir el anclaje y fusión de ambas membranas. Al fusionarse se constituye un poro por donde se daría la exocitosis de la hormona.

Fue reportado que la expresión de SNAP-25 probablemente esté correlacionada con la liberación de PRL y ACTH (Majó *et al.* 1997). En contraste a esto, observamos niveles bajos de SNAP-25 y niveles altos de LH después de la incubación con GnRH. Es posible que aún cantidades disminuidas de SNAP-25 puedan provocar una respuesta fisiológica.

## CONCLUSIÓN

En conclusión, nuestro estudio mostró que SNAP-25 está involucrada en la liberación de LH y que la GnRH puede modificar su expresión. Los cambios paralelos en la expresión de mRNA para SNAP-25 y la significancia funcional de la baja expresión de SNAP-25 encontrados en células adenohipofisarias en cultivo o en adenohipófisis durante el proceso de secreción, está por ser elucidada.

## Agradecimientos:

Nuestro reconocimiento a los estudiantes de LAQB Raúl Loera Valencia y Néstor Nivardo Jiménez Vargas por su apoyo en la elaboración del material gráfico.

Este artículo fue publicado en la revista: *Endocrine Regulations*, 38: 1-6, (2004) bajo el título "Pituitary synaptic protein SNAP-25 sensitive to GnRH is necessary for LH release", autores: J. Luis Quintanar, Eva Salinas, Rosa María Chávez Morales y Andrés Quintanar Stephano.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUADO F, GOMBÁU L, MARSAL J, BLANCO J, BLASI J. *Regulated secretion is impaired in Art-20 "endocrine cells stably transfected with botulinum neurotoxin type A light Caín"*. Chem 272, 26005-26008, 1997.
- COORSSSEN Jr, BLANK PS, ALBERTORIO F, BEZRUKOV L, KOLOSOVA I, CHEN X, BACKLUND PS, Zimmerberg J. *Regulated secretion: SNARE density, vesicle fusion and calcium dependence*. J Cell Sci 116, 2087-2097, 2003.
- GUTIÉRREZ LM, QUINTANAR JL, RUEDA J, VINEGRA S, REIG JA. *The protein phosphatase inhibitor calyculin-A affects catecholamine secretion and granular distribution in cultured adrenomedullary chromaffin cells*. Eur J Cell Biol 68, 88-95, 1995.
- HEPP R, LANGLEY K. *SNAREs during development*. Cell Tissue Res 305, 247-253, 2001.
- JACOBSSON G, MEISTER B. *Molecular components of the exocytosis machinery in the rat pituitary gland*. Endocrinology 137, 5344-5356, 1996.
- JACOBSSON G, RAZANI H, OGREN SO, MEISTER B. *Estrogen down-regulates mRNA encoding the exocytotic protein SNAP-25 in the rat pituitary gland*. J Neuroendocrinol 10, 157-163, 1998.
- MAJÓ G, FERRER I, MARSAL J, BLASI J, AGUADO F. *Immunocytochemical analysis of the synaptic proteins SNAP-25 and Rab3A in human pituitary adenomas. Overexpression of SNAP-25 in the mammosomatotroph lineages*. J Pathol 183, 440-446, 1997.
- MASUMOTO N, IKEBUCHI Y, MARSUOKA T, TASAKA K, MIYAKE A, MURATA Y. *Involvement of SNAP-25 in TRH-induced exocytosis in pituitary GH4Cl cells*. J Endocrinol 153, R5-R10, 1997.
- QUINTANAR JL, SALINAS E. *Effect of hypothyroidism on synaptosomal-associated protein of 25 kDa and syntaxin-1 expression in adenohipophyses of rat*. J Endocrinol Invest 25, 754-758, 2002.
- SALINAS E, QUINTANAR JL, Reig JA. *Immunohistochemical study of syntaxin-1 and SNAP-25 in the pituitaries of mouse guinea pig and cat*. Acta Physiol Pharmacol Therapeut Latinoamerican 49, 61-64, 1999.
- STOJILKOVIC, SS, REINHART J, CATT KJ. *Gonadotropin-releasing hormone receptors. Structure and signal transduction path-ways*. Endocrine Rev 15, 462-499, 1994.