

11261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

"Efecto directo de esteroides ováricos sobre la secreción de GnRH"

Tesis presentada por

Eileen Uribe Quere

Para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Asesor:

Dr. Gerardo Martínez de la Escalera Lorenzo

Centro de Neurobiología

Campus UNAM-UAQ, Toluca

Agosto del 2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Universidad Nacional Autónoma de México

## Centro de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Eileen Uribe Querol, cuyo título es: "Efecto Directo de esteroides ováricos sobre la secreción de GnRH" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente: Dr. Carlos Manuel Valverde Rodríguez

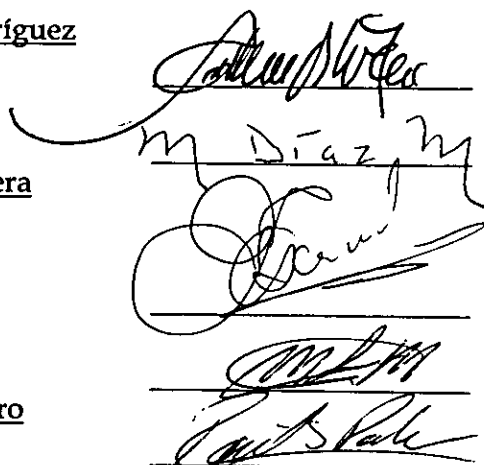
Secretario: Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Vocal: Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Lorenzo

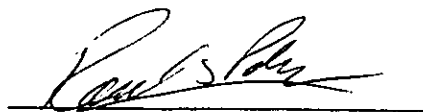
Suplente: Dra. Maricela Luna Muñoz

Suplente: Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero



Handwritten signatures of the members of the Tutorial Committee, corresponding to the names listed on the left. The signatures are written over horizontal lines.

Aprobado por el Comité Académico



Handwritten signature of the Program Coordinator, written over a horizontal line.

Coordinador del Programa

## Resumen

En los vertebrados, las conductas y la función reproductiva facilitan la adaptación y la evolución de las especies animales, a través de promover la recombinación genética y así la diversidad fenotípica. Por esta razón, es de la mayor importancia la dilucidación de los mecanismos celulares y moleculares responsables de regular las conductas y la función reproductiva. En términos generales, la fisiología reproductiva esta sujeta a un estricto control endócrino en el que intervienen diversas hormonas. La producción de dichas hormonas es regulada por mecanismos de retroalimentación positiva y/o negativa en los cuales la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) juega un papel central. En este esquema, la GnRH estimula la síntesis y liberación de las hormonas hipofisarias estimulante de los folículos (FHS) y luteinizante (LH) que controlan la producción de las hormonas gonadales estrógenos, progesterona y testosterona, que en turno regulan la función y conducta reproductiva. Si bien este mecanismo general esta bien documentado, las interacciones celulares finas que le subyacen aún son motivo de intensa investigación. Con relación a los mecanismos que regulan la liberación de la GnRH, se ha documentado que el estradiol y la progesterona regulan de manera indirecta su liberación, a través de modular la actividad de las vías aferentes opioidérgicas, catecolaminérgicas y GABAérgicas. Por otro lado, se ha mostrado también que los estrógenos y la progesterona son capaces de ejercer acciones directas sobre las neuronas GnRHérgicas, modificando la respuesta de estas células a algunos neurotransmisores, como por ejemplo a la norepinefrina. En este mismo

contexto, el propósito del presente trabajo fue el de conocer si el 17 $\beta$ -estradiol y la progesterona modulan la acción postsináptica del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) sobre las neuronas GnRHérgicas. Para ello, se utilizaron neuronas GnRHérgicas inmortalizadas GT<sub>1-7</sub> en suspensión, con el propósito de evaluar los cambios de los transitorios de calcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) consecutivos a la aplicación de GABA, en presencia o ausencia de preincubaciones con estradiol y progesterona. Nuestros resultados muestran que la preincubación con estradiol (100nM) por 24 horas no modifica la amplitud de los transitorios de calcio generados por GABA en las neuronas GT<sub>1-7</sub>. Sin embargo, la preincubación con progesterona (20nM) por 6 horas antes de la aplicación del GABA disminuye la amplitud de los transitorios de calcio generados por este neurotransmisor. En contraste, la preincubación con estradiol (100nM) por 24 horas, coincidente con progesterona (20nM) durante las últimas 6 horas, aumenta los transitorios de calcio generados por GABA. Estos resultados muestran que la progesterona modula negativamente la respuesta a GABA y que los esteroides gonadales, actuando de manera sinérgica, facilitan la respuesta postsináptica de las neuronas GnRHérgicas al GABA, sugiriendo que ejercen una acción directa sobre dichas neuronas.

### **Abstract**

In vertebrates, reproductive function and behavior facilitates adaptation and evolution of living animal species, by promoting genetic recombination and phenotypic diversity. Unraveling principles and mechanisms underlying

contexto, el propósito del presente trabajo fue el de conocer si el  $17\beta$ -estradiol y la progesterona modulan la acción postsináptica del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) sobre las neuronas GnRHérgicas. Para ello, se utilizaron neuronas GnRHérgicas inmortalizadas GT<sub>1-7</sub> en suspensión, con el propósito de evaluar los cambios de los transitorios de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) consecutivos a la aplicación de GABA, en presencia o ausencia de preincubaciones con estradiol y progesterona. Nuestros resultados muestran que la preincubación con estradiol (100nM) por 24 horas no modifica la amplitud de los transitorios de calcio generados por GABA en las neuronas GT<sub>1-7</sub>. Sin embargo, la preincubación con progesterona (20nM) por 6 horas antes de la aplicación del GABA disminuye la amplitud de los transitorios de calcio generados por este neurotransmisor. En contraste, la preincubación con estradiol (100nM) por 24 horas, coincidente con progesterona (20nM) durante las últimas 6 horas, aumenta los transitorios de calcio generados por GABA. Estos resultados muestran que la progesterona modula negativamente la respuesta a GABA y que los esteroides gonadales, actuando de manera sinérgica, facilitan la respuesta postsináptica de las neuronas GnRHérgicas al GABA, sugiriendo que ejercen una acción directa sobre dichas neuronas.

### **Abstract**

In vertebrates, reproductive function and behavior facilitates adaptation and evolution of living animal species, by promoting genetic recombination and phenotypic diversity. Unraveling principles and mechanisms underlying

reproductive physiology is thus of the major importance from a biological perspective. It is long known that reproductive physiology is regulated by a functional interplay of hormonal messengers. Among them, gonadal hormones play a central role as regulatory factors, acting through positive and negative feedback mechanisms. In this scenario, estrogens and progesterone modulate the synthesis and secretion of the hypothalamic gonadotropin release hormone (GnRH), and thus of the hypophysial gonadotropins (i.e., follicle stimulating and luteinizing hormones). Although the general rules governing this feedback mechanism have been firmly established, details on the cellular and molecular events underlying it are still open issues waiting for answers. Regarding the effects of estrogens and progesterone on GnRH release, it has been documented that both steroid hormones indirectly regulate GnRH secretion process through modulating opioidergic, catecholaminergic, and GABAergic afferent activity. It has also been shown, none the less, that estrogens and progesterone may also have direct effects on GnRHergic neurons activity by modulating their response to some neurotransmitters, as it has been shown for norepinephrine. In the same vein, the aim of the present work was to evaluate whether estradiol and progesterone modulate GnRHergic neurons activity in response to GABA. Transformed GnRHergic neurons (GT<sub>1-7</sub> cell line) were then cultured, and their response to GABA application, in the presence or absence of preincubations of gonadal steroids, monitored by measuring changes in intracellular calcium transients. Our results showed that preincubation with either estradiol (100nM) for 24 hours does

not modify the magnitude and frequency of GnRHergic neurons calcium transients induced by this neuroactive molecule. Never the less, preincubation with progesterone (20nM) during 6 hours prior to GABA application, depress the calcium transients induced by GABA. In contrast, when estradiol was preincubated for 18 hours followed by a co-preincubation of estradiol and progesterone for 6 hours, GnRHergic neurons responses to GABA were facilitated. Indeed, the preincubation with progesterone decreased the response of the neurons and the simultaneous preincubation with both gonadal steroids increased the amplitude and frequency of calcium transients in transformed GnRHergic neurons. These observations thus show that gonadal steroids modulate the GnRHergic neurons response to GABA through synergistic mechanisms, supporting a direct action on GnRH neurons.

## ÍNDICE

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| Página del Título                                             | 1  |
| Página de firmas                                              | 2  |
| Resumen español                                               | 3  |
| Resumen inglés                                                | 4  |
| Índice                                                        | 7  |
| Introducción                                                  | 10 |
| Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas                              | 11 |
| Esteroides Gonadales                                          | 14 |
| Efectos fisiológicos de los esteroides gonadales              | 14 |
| Estructura química y síntesis de los esteroides gonadales     | 18 |
| Receptores y mecanismo de acción de los esteroides gonadales  | 22 |
| Neuronas GnRHérgicas                                          | 24 |
| Aspectos Anatómicos                                           | 24 |
| Aspectos embriológicos                                        | 25 |
| Hormona Liberadora de Gonadotropinas                          | 26 |
| Síntesis                                                      | 26 |
| Liberación episódica de la GnRH                               | 27 |
| Regulación GABAérgica de la liberación de la GnRH             | 30 |
| Regulación por esteroides ováricos sobre neuronas GnRHérgicas | 32 |

|                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Hipótesis                                                                                                                                                                                                   | 35 |
| Objetivos                                                                                                                                                                                                   | 36 |
| Materiales y Métodos                                                                                                                                                                                        | 38 |
| Cultivo de células                                                                                                                                                                                          | 38 |
| Determinación de la concentración de calcio intracelular                                                                                                                                                    | 39 |
| Incorporación del fluoróforo                                                                                                                                                                                | 39 |
| Células en suspensión                                                                                                                                                                                       | 39 |
| Células en monocapa                                                                                                                                                                                         | 40 |
| Resultados                                                                                                                                                                                                  | 41 |
| Estandarización del método fluorométrico                                                                                                                                                                    | 41 |
| Efecto de ionomicina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en células GT <sub>1-7</sub>                                                                                                                                    | 51 |
| Determinación de los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en células GT <sub>1-7</sub> consecutivas a la administración de GABA                                                                                      | 53 |
| Modulación por 17 $\beta$ -estradiol de las respuestas en la $[Ca^{2+}]_i$ generadas por ionomicina, en células GT <sub>1-7</sub> , preincubadas con esteroides                                             | 55 |
| Modulación por 17 $\beta$ -estradiol de las respuestas en la $[Ca^{2+}]_i$ generadas por GABA, en células GT <sub>1-7</sub> , preincubadas con esteroides                                                   | 58 |
| Modulación por 17 $\beta$ -estradiol, progesterona y el tratamiento combinado de ambos de las respuestas en la $[Ca^{2+}]_i$ generadas por GABA, en células GT <sub>1-7</sub> , preincubadas con esteroides | 60 |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| Discusión                  | 63 |
| Conclusiones               | 68 |
| Bibliografía               | 71 |
| Índice de Figuras y tablas | 83 |

## INTRODUCCIÓN

La función reproductiva y las estrategias de apareamiento constituyen la piedra angular de la variabilidad fenotípica en los mamíferos. Dicha variabilidad permite, por un lado, la adaptación adecuada a nichos ecológicos específicos, y por el otro, la selección de fenotipos que sustentan la evolución biológica (Slater y Halliday, 1994). Debido a que la reproducción sexual funciona como un mecanismo adaptativo, se requiere que ésta responda a las fluctuaciones de distintos factores ambientales tales como la temperatura, la luz y la alimentación, entre otros. Estos factores modifican el *status* reproductivo a través de alterar las concentraciones de hormonas sexuales, las que a su vez conllevan a cambios en la actividad metabólica y en los estados afectivo y receptivo del organismo (Knobil y Neill, 1994).

Como se mencionó anteriormente, el cerebro recibe una serie de señales tanto internas como externas que afectan a la reproducción. Toda esta información es integrada por diversas estructuras cerebrales que proyectan y convergen sobre las neuronas GnRHérgicas, las que orquestan la función reproductiva a través de un mensajero llamado hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). Esta hormona es liberada al sistema porta-hipofisiario a través del cual alcanza receptores específicos en los gonadotropos de la hipófisis, donde ejerce su efecto. Es importante señalar que la organización espacio-temporal de la GnRH impone un orden temporal a la función reproductiva. La hipófisis funge como un amplificador de la señal generada por la GnRH, y libera al torrente sanguíneo a las gonadotropinas. Estas hormonas actúan en las gónadas regulando los procesos de

gametogénesis y de esteroidogénesis. Finalmente, los esteroides gonadales regulan la función de los órganos sexuales periféricos, la secreción de GnRH y hormonas hipofisarias, así como el desarrollo y expresión de las conductas sexuales.

### **Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas**

El sistema endócrino de los vertebrados está constituido por una serie de glándulas relacionadas funcionalmente entre sí. De éstas, el hipotálamo, localizado en la región diencefálica del cerebro, constituye el órgano rector desde el cual se producen mensajes químicos cuya finalidad es la de modular diversas funciones a través de regular la producción y liberación de hormonas desde la glándula hipófisis. La hipófisis desempeña el papel de amplificador de las señales centrales, produciendo mensajeros químicos que actúan como relevos de éstas y son vertidos a la circulación sistémica, en grandes cantidades. Una vez en la circulación, las hormonas hipofisarias alcanzan distintas glándulas blanco, y de esta forma ejercen acciones moduladoras sobre diversas funciones. En los casos donde estas funciones implican la producción y liberación de hormonas liberadas por las glándulas blanco de aquellas hipofisarias, éstas modulan por retroalimentación, la producción y liberación de las hormonas hipotalámicas e hipofisarias, cerrando así un circuito que permite variar en forma dinámica y dentro de rangos normales, las características fisiológicas del medio interno. Es importante mencionar que la liberación hipotalámica de hormonas rectoras esta sujeta a la regulación neuronal descendente que permite el ajuste de las funciones respectivas ante una gran

diversidad de estímulos ambientales e internos (e.g., estímulos sensoriales y el estado nutricional).

Como se esquematiza en la Figura 1, la función reproductiva y la maduración sexual dependen de un sistema hormonal integrado de la manera descrita en el párrafo anterior. En dicho sistema, un grupo de neuronas hipotalámicas producen un mensajero químico, la GnRH, el cual es liberado, de manera episódica, a los vasos portales hipotálamo-hipofisarios. Esta hormona alcanza a los gonadotropos localizados en el lóbulo anterior de la glándula hipófisis, donde regula la producción y liberación de las hormonas luteinizante (LH) y estimulante de los folículos (FSH), conocidas genéricamente como gonadotropinas.

Una vez en la circulación, ambas hormonas hipofisarias alcanzan al ovario y al testículo, en donde promueven la gametogénesis, así como la síntesis y secreción predominantemente de estradiol y progesterona en la hembra, y de testosterona en el macho. Estos esteroides, en conjunto con las gonadotropinas, ejercen efectos diversos sobre la expresión de conductas sexuales y no sexuales y determinan el desarrollo de los órganos sexuales periféricos. Además, los esteroides gonadales regulan de manera positiva y negativa la producción y liberación de hormonas hipotalámicas e hipofisarias, asegurando así la competencia reproductiva. (Knobil y Nelly, 1994).

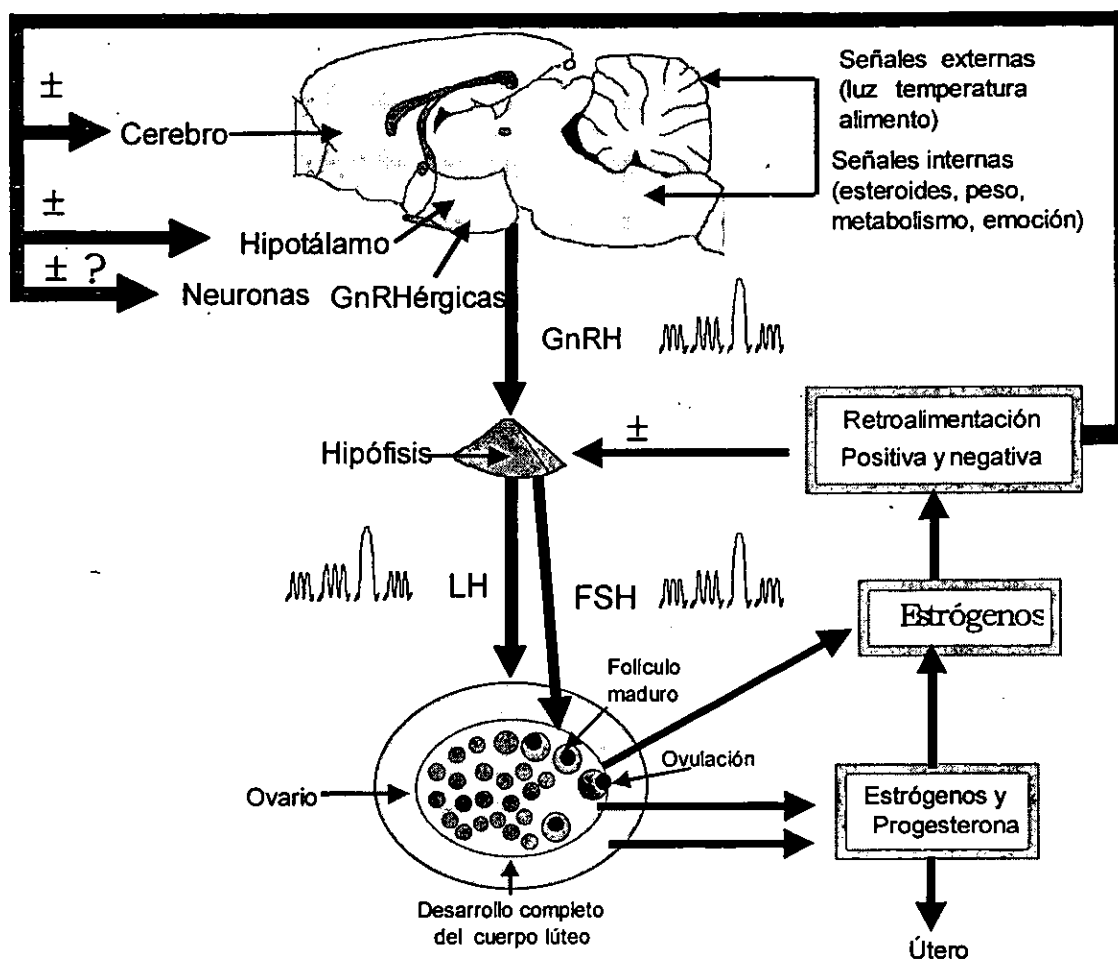


Figura 1 Eje Hipotálamo-hipófisis-gónadas: Distintos estímulos externos (luz, temperatura, disponibilidad de alimento, etc.) e internos (concentración plasmática de esteroides, estado metabólico, peso corporal, cantidad de grasa, emociones, receptividad del sexo opuesto, etc.) afectan a la función reproductiva. Toda esta información es integrada por diversos grupos de neuronas cuya vía aferente alcanza a las neuronas GnRHérgicas en el hipotálamo mediobasal y el área preóptica. Estas neuronas controlan la secreción de las gonadotropinas hipofisiarias (LH y FSH), las que a su vez regulan la función gonadal. El circuito se cierra por una retroalimentación ejercida por los esteroides gonadales tanto a nivel central como hipofisiario.

## **Esteroides Gonadales**

### **a) Efectos fisiológicos de los esteroides gonadales**

En los mamíferos, los esteroides sintetizados en los ovarios y testículos afectan el desarrollo sexual temprano y tardío tanto somático como cerebral (McEwen, 1996).

Los esteroides sexuales, estimulan el crecimiento y la diferenciación celular de órganos sexuales y no sexuales durante la vida intra y extrauterina. Regulan el comportamiento reproductivo, las conductas de agresión, socialización y conservación de las especies, así como algunos aspectos motivacionales y afectivos de los procesos cognitivos y de locomoción (Schunlkin, 1993). Los estrógenos también promueven la formación de hueso, y por tanto, participan en la regulación de la homeostasis del calcio plasmático. En las aves, los esteroides gonadales regulan el cambio de plumaje y la generación de neuronas destinadas a formar parte de los núcleos que median el aprendizaje del canto durante la temporada de apareamiento en machos (Chester-Jones *et al.*, 1987). En algunas especies de venados se ha mostrado que los esteroides gonadales regulan el crecimiento de las astas, órganos utilizados en conductas de despliegue y agresión durante la época reproductiva (Marler y Hamilton, 1966).

Desde el punto de vista endócrino, nuevamente en los mamíferos, los esteroides gonadales participan como moduladores de la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y de la prolactina (Knobil y Neill, 1994). Esta última función es de gran importancia pues da origen a un proceso cíclico que controla y coordina los periodos de fecundidad y receptividad sexual. La existencia de éste ciclo

denominado menstrual para las hembras de los primates y estral para otras especies de mamíferos (particularmente en roedores) se ha documentado ampliamente. En la mujer, el ciclo menstrual se extiende por un periodo promedio de 28 días, y se divide en tres fases llamadas folicular, ovulatoria y lútea. Desde el punto de vista endócrino, la fase folicular, que se extiende por 12 días aproximadamente, se caracteriza por el incremento progresivo de las concentraciones plasmáticas de FSH, que conduce a un aumento igualmente progresivo de las concentraciones plasmáticas de estrógenos ováricos. Una vez alcanzada una concentración crítica de estrógenos en plasma hacia la mitad del ciclo, estos promueven la liberación relativamente súbita de la LH que al alcanzar el ovario induce la ovulación y la consecuente formación del cuerpo lúteo. La fase ovulatoria tiene una duración aproximada de 1 a 3 días. La formación del cuerpo lúteo sustenta la producción y secreción de la progesterona. La concentración plasmática de esta hormona, junto con aquella de la LH, incrementan conforme la fase lútea progresa (duración aproximada 13 a 14 días). Simultáneamente, los niveles plasmáticos de estrógenos y de la FSH decaen. Con esto, el endometrio prolifera y se desarrolla hasta alcanzar las condiciones necesarias para permitir la implantación del cigoto en caso de que haya ocurrido la fecundación. En ausencia de fecundación, y hacia el final del ciclo menstrual, se observa un descenso de los niveles de todas las hormonas hipofisarias y gonadales que llevan al desprendimiento del endometrio y a la reiniciación del ciclo. Los cambios endócrinos descritos se acompañan de cambios estructurales cíclicos en las mamas,

en el útero y en los ovarios. Estos eventos preparan el cuerpo de la mujer para el embarazo y la maternidad en caso de que exista fecundación (Figura 2).

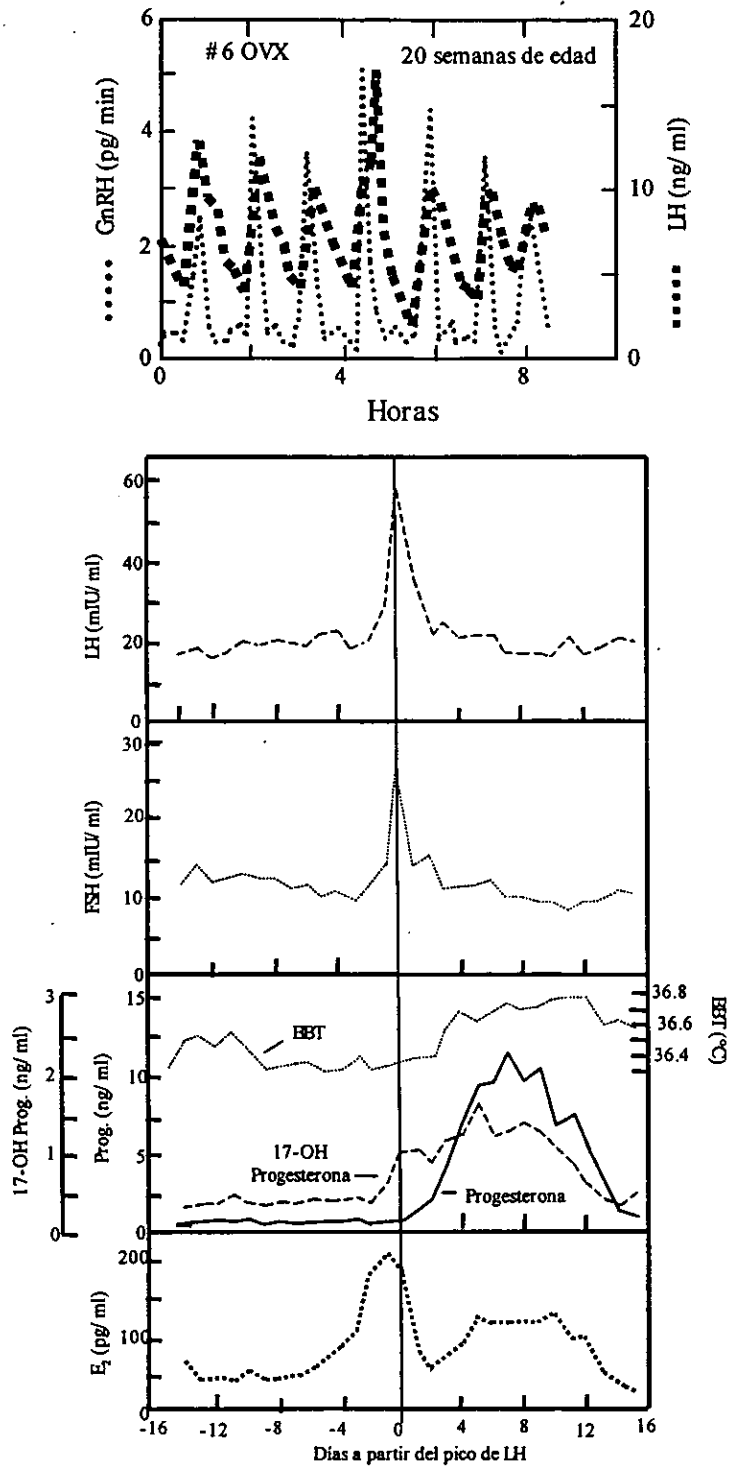


Figura 2. Cambios en los niveles hormonales durante el ciclo menstrual. En la parte superior se muestran los pulsos de GnRH en sangre portal y su concordancia con los pulsos de LH en sangre sistémica en ovinos, Obsérvese que la hipófisis es un amplificador de la señal central de la GnRH, la cual es reproducida con una alta eficiencia. En la parte inferior se muestran los cambios en los niveles plasmáticos de LH, FSH, progesterona, estradiol, y 17-hidroxiprogesterona durante el ciclo menstrual en humanos. El día del pico de LH es considerado el día cero. Los cambios en la temperatura basal del cuerpo (BBT) inducidos por progesterona también se representan en el esquema. Modificado de Knobil y Neill, 1994 y de Griffin y Ojeda, 1992.

Es importante entonces recalcar que todos los cambios en las concentraciones plasmáticas de las hormonas hipofisarias y ováricas que ocurren a lo largo del ciclo menstrual, resultan de modificaciones en los patrones de secreción de la GnRH (Clarke y Cummins, 1982; Levine y Duffy, 1988), los que a su vez son modulados por múltiples aferencias neuronales y por la retroacción de estrógenos, andrógenos y progestágenos (Figura 2)

En mamíferos, incluyendo al ser humano, no solamente las hembras presentan un mecanismo cíclico de regulación de la fecundidad y la receptividad sexual. Los machos también poseen un mecanismo endócrino cíclico que regula la diferenciación y maduración de los gametos. Este evento no ha sido tan bien documentado como en la hembra, debido a la dificultad de evaluar el estado funcional en cientos de tubos seminíferos que conforman al testículo, en los cuales se generan gametos de manera asincrónica, lo que permite al macho ser fértil potencialmente todos los días de su vida. No obstante esto, la producción de espermatozoides varía diariamente a lo largo del ciclo del epitelio seminífero. Si se analizan tubos seminíferos individuales, los efectos cíclicos de la liberación de

testosterona asociados a los cambios en la producción de las gonadotropinas y de la GnRH se hacen evidentes. El ciclo del epitelio seminífero tiene una duración aproximada de 64 días en el hombre. Durante este tiempo, las espermatogonias A dan origen a cuatro generaciones de espermatogonias B, una de las cuales se diferenciará de manera secuencial hacia espermatocito, espermátida y espermatozoide inmaduro (Knobil y Neill, 1994).

b) Estructura química y síntesis de los esteroides gonadales

Los esteroides gonadales constituyen una familia de hormonas lipídicas derivadas del colesterol. Su estructura básica, el fenantreno, esta formada por tres anillos aromáticos de benceno condensados. Esta configuración da una gran versatilidad estructural pues a partir de ella, a través de modificar algunos de sus sustituyentes y el número de dobles ligaduras, se pueden obtener una diversidad de derivados entre los que se encuentran el colesterol y las hormonas esteroides (Figura 3).

Como se mencionó anteriormente, las hormonas esteroides derivan del colesterol. Este compuesto orgánico juega un papel esencial en el metabolismo celular pues funge como precursor no solamente de hormonas esteroides, sino también de las sales biliares necesarias para emulsificar a las grasas provenientes de la dieta, en la luz intestinal. Además, el colesterol forma parte importante de la estructura de las membranas celulares, y algunos de sus derivados dan origen a las vitaminas A, E y K, a los dolicoles (moléculas transportadoras de lípidos que sirven como precursores para la síntesis de glicolípidos), y a la ubiquinona (compuesto involucrado en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria).

La síntesis del colesterol ocurre en cuatro fases. En la primera fase, tres unidades de acetato derivadas de la acetil Co-A se condensan para dar lugar a una cadena alifática de hidrocarburo constituida por seis carbonos conocida como mevalonato. En la segunda fase, la molécula de mevalonato es "activada" a través de la adición de tres grupos fosfato a los carbonos tres y cinco de su cadena. En la tercera etapa, la remoción subsecuente de un grupo fosfato y del carboxilo inicial genera una doble ligadura, y así una cadena alifática de cinco carbonos conocida como isopreno. La condensación de cinco moléculas de isopreno activadas da origen al escualeno, cuya cadena hidrocarbonada contiene 30 átomos de carbono. Finalmente, la ciclización del escualeno lleva a la formación de los anillos A, B, C y D del núcleo de colesterol, y la subsecuente oxidación y modificación de la posición de los grupos metilo, da como resultado la molécula del colesterol.

Una vez formado en el hígado, el colesterol puede ser transferido con la ayuda de apolipoproteínas plasmáticas (una vez conjugadas con el colesterol o sus derivados se designan lipoproteínas de baja densidad) hacia los órganos en los que será utilizado. En el caso de las hormonas gonadales, el colesterol es transformado, en células ováricas y testiculares, a través de una serie de reacciones secuenciales en pregnenolona, progesterona, testosterona y estradiol. La síntesis de todas estas hormonas requiere de la remoción de algunos o todos los carbonos en la cadena lateral que se une al carbono 17 del anillo D del colesterol. Esto se logra mediante reacciones de hidroxilación y oxidación.

En la Figura 3 se ilustra la vía metabólica con las reacciones que conducen de un compuesto a otro, la mayoría con acciones biológicas propias pero que funcionan también como precursores de los compuestos subsecuentes.

El primer paso de la síntesis de esteroides gonadales es la conversión de colesterol, que contiene 27 carbonos en pregnanolona, compuesto de 21 carbonos en una reacción realizada por el complejo enzimático conocido como citocromo p450. Esta reacción ocurre en la mitocrontria, siendo un paso limitante en la biosíntesis de esteroides. La pregnanolona se puede convertir en progesterona por medio de una enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, o en  $17\alpha$ -hidroxipregnanolona por medio de una  $17\alpha$ -hidroxilasa. Ambas, la progesterona y la  $17\alpha$ -hidroxipregnanolona pueden, a su vez, ser metabolizadas en  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona. La  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona es substrato de la  $17,20$ -liasa y convertida en androstenediona ya con 19 carbonos. Este metabolito es convertido en estrona (con 18 carbonos) mediante una aromatasa o en testosterona por la enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Ambas, la estrona y la testosterona son precursores del estradiol. La estrona es convertida en estadiol por medio de una enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la testosterona a través de la remoción del carbono 19 y la aromatización del anillo A del andrógeno.

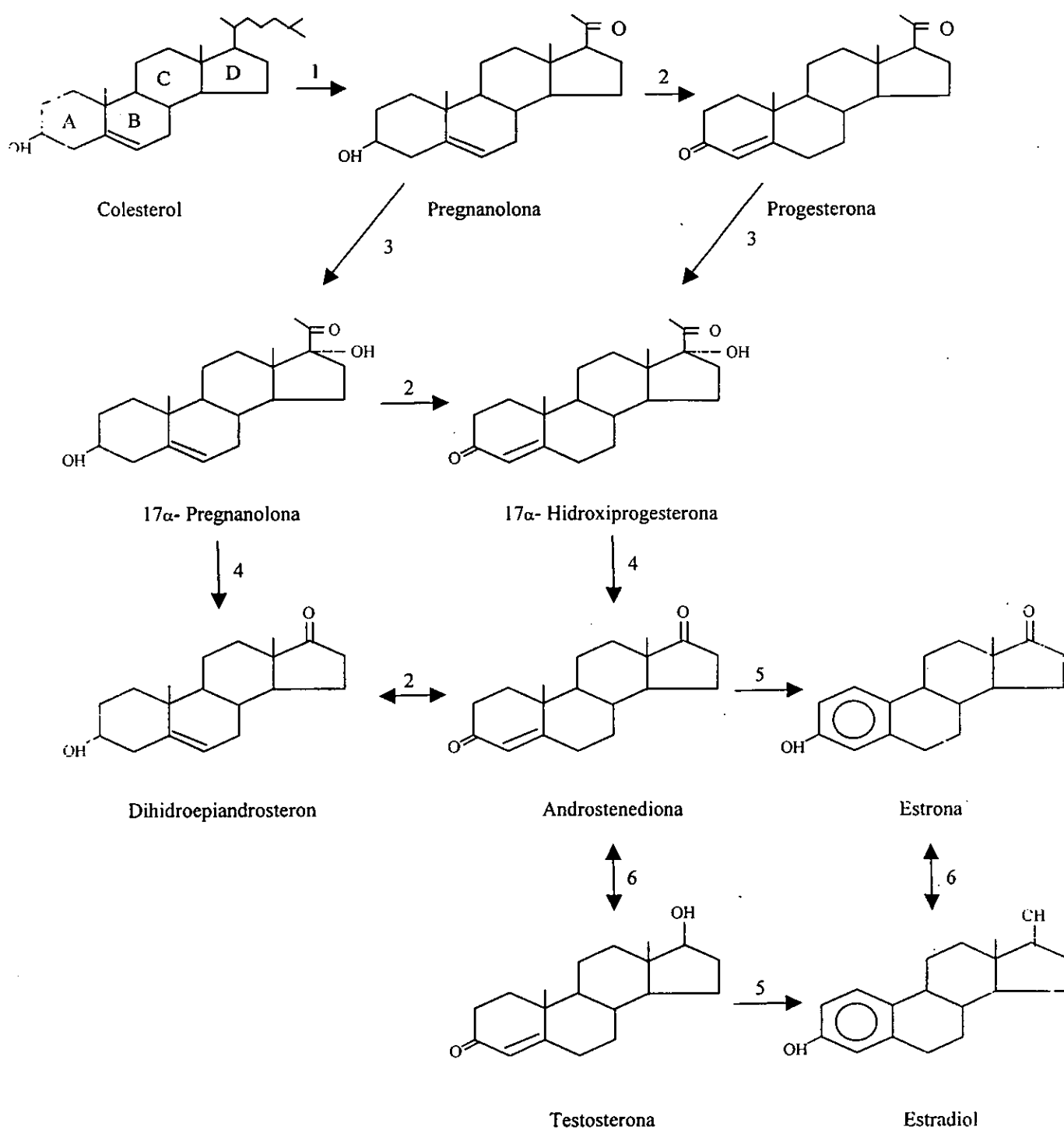


Figura3. Biosíntesis de esteroides ováricos. 1. Complejo enzimático que corta la cadena lateral del colesterol; 2. 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 3. 17 $\alpha$ -hidroxilasa; 4. 17,20-liasa; 5. Aromatasa 6. 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

### c) Receptores y mecanismo de acción de los esteroides gonadales

Después de ser secretados por el ovario y el testículo, y dada su insolubilidad en agua, los esteroides gonadales son transportados hacia sus órganos blanco por globulinas plasmáticas (Griffin y Ojeda, 1992). Una vez que alcanzan su órgano blanco, los esteroides pueden ejercer sus efectos a través de dos mecanismos distintos.

El mecanismo de acción más estudiado de las hormonas esteroides en general, y de aquellas secretadas por las gónadas en particular, ha revelado que una vez que estas hormonas atraviesan la membrana celular, difunden al citoplasma y finalmente se unen a receptores citoplásmicos y nucleares (Figura 4). Esta unión conduce a una homodimerización del complejo ligando-receptor que cambia la conformación del mismo.

El cambio de conformación de las proteínas del receptor le confiere a éste un incremento en la afinidad por secuencias de ADN, conocidas como elementos de respuesta a esteroides, localizados en regiones reguladoras de genes blanco. Así, el complejo esteroide-receptor funciona como factor de transcripción al unirse a los elementos de respuesta a esteroides en el ADN, facilitando o suprimiendo la transcripción genética y la producción de la proteína correspondiente (Katzenellenbogen, 1996; Tsai y O'Malley, 1994). Los receptores para esteroides también pueden ser activados en ausencia de su ligando nativo por factores de crecimiento u otros agentes capaces de aumentar los niveles de AMP cíclico (Aronica y Katzenellenbogen, 1993; Ignar-Trowbridge *et al.*, 1993).

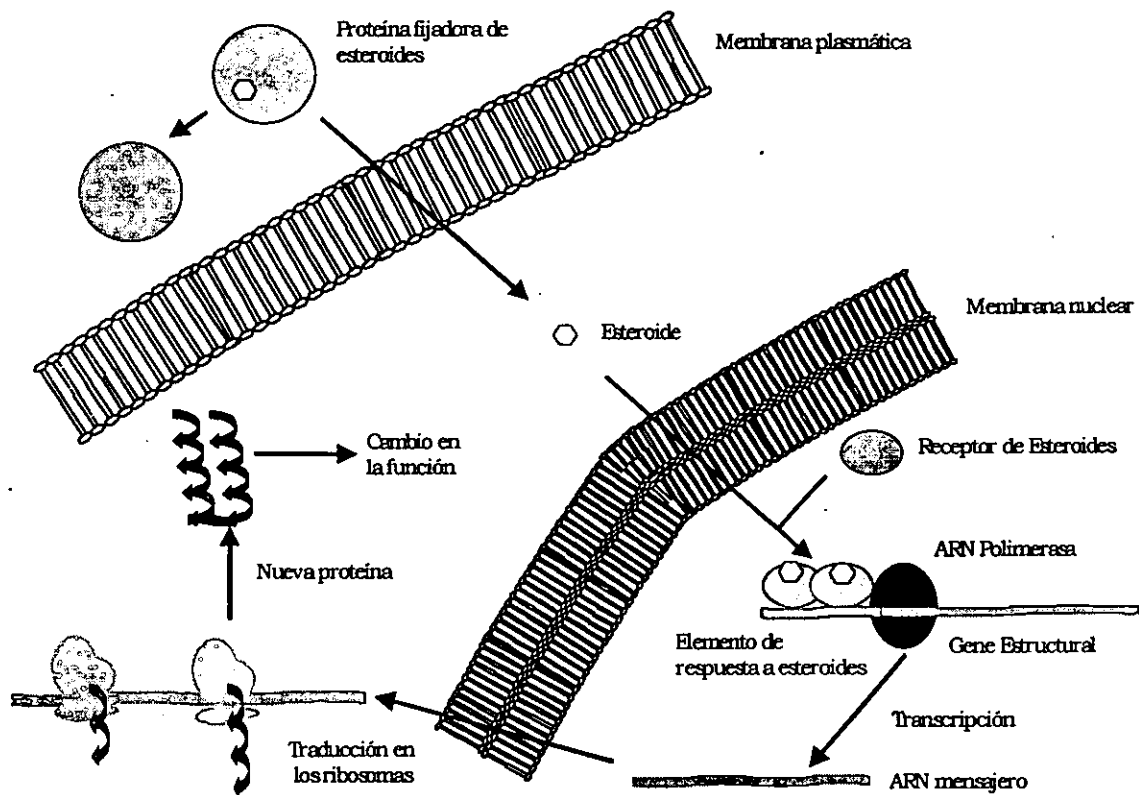


Figura 4. Representación esquemática de los elementos intracelulares de respuesta a esteroides. Las hormonas esteroides viajan en el torrente sanguíneo unidas a proteínas específicas. Los esteroides se unen con una alta afinidad a receptores nucleares. Los receptores se dimerizan y funcionan como factores de transcripción, promoviendo la síntesis de ARNm y consecuentemente actúa aumentando la síntesis de proteínas específicas.

Los receptores nucleares para los esteroides gonadales forman parte de una superfamilia de proteínas que incluyen además a los receptores para retinoides, tirosina, vitamina D y otros aún sin ligando conocido (Evans, 1988). Los receptores de esta superfamilia comparten características en su estructura general, y poseen un alto porcentaje de homología estructural en la secuencia que corresponde a los

sitios de unión con el ADN (Griffin y Ojeda, 1992). Sin embargo, las secuencias primarias en el extremo carboxilo terminal, donde reside la capacidad de unir a los distintos ligandos, difieren significativamente en los diferentes receptores. Algunos de los receptores a esteroides gonadales presentan más de una isoforma (e.g., receptores  $\alpha$  y  $\beta$  para estradiol; Kuiper *et al.*, 1996; Mosselman *et al.*, 1996). Estas variantes resultan de la transcripción de diferentes genes, y no de la traducción o del procesamiento diferencial del ARN mensajero o del precursor proteico correspondiente (Joëls y de Kloet, 1992).

No obstante que el modelo arriba descrito es el más conocido, recientemente se ha documentado la existencia de receptores membranales para estrógenos (Moss *et al.*, 1997). Estos últimos actúan sobre canales iónicos modificando su permeabilidad directamente, o bien a través de su acoplamiento a sistemas de segundos mensajeros. Por lo tanto, la interacción de los estrógenos con sus receptores membranales induce cambios en excitabilidad celular (Tsai y O'Malley, 1994; Parker *et al.*, 1993; Katzenellenbogen, 1996). La función de estos receptores puede ser modulada a través de modificaciones postraduccionales como la fosforilación (Weigel, 1996).

### **Neuronas GnRHérgicas**

#### **a) Aspectos Anatómicos**

Las células GnRHérgicas constituyen una población relativamente homogénea de neuronas localizadas en el hipotálamo anterior y en el área preóptica media. A diferencia de otros grupos de células neuroendocrinas, las neuronas GnRHérgicas

no están confinadas en un núcleo definido, sino que se encuentran dispersas a lo largo de estas regiones (Silverman y Krey, 1978; Merchenthaler *et al.*, 1984). El número total de estas neuronas en la rata se ha estimado en 2,000 (Merchenthaler *et al.*, 1984). De ellas, cerca del 60 al 70% proyectan hacia la eminencia media, lugar en donde alcanzan al sistema vascular portal hipotálamo-hipofisario, en el cual vierten sus productos secretorios (la GnRH, el péptido asociado a la GnRH (GAP) y la galanina; Silverman *et al.*, 1987; Merchenthaler *et al.*, 1989). Además de esta proyección, existen otras que relacionan anatómicamente a las neuronas GnRHérgicas con el área preóptica-septal, con el órgano vasculoso de la lámina terminal, con el órgano subfornical, con la estría medular y con la amígdala medial. Las neuronas GnRHérgicas reciben innumerables aferencias de terminales neuronales, entre las que se incluyen a la serotonina (Kiss y Halasz, 1985),  $\beta$ -endorfinas (Chen *et al.*, 1989 A; Chen *et al.*, 1989 B; Thind y Goldsmith, 1988), GABA (Leranth *et al.*, 1988; Witkin, 1992), dopamina (Karaviti y Angelides, 1993), vasopresina (Thind *et al.*, 1991) y glutamato (Goldsmith *et al.*, 1992).

#### b) Aspectos embriológicos

En los roedores, y en particular en el ratón, se ha estudiado a profundidad el desarrollo de las neuronas GnRHérgicas, las cuales se originan en la región rostral del tubo neural que da origen al bulbo olfatorio. Estas neuronas pueden ser identificadas a partir del día 8.5 de vida embrionaria (Silverman *et al.*, 1988). Este grupo neuronal migra (edad embrionaria 12.5 a 16.5 días) a través del septo nasal, y pasando a lo largo de las regiones ventral anterior y ventromedial anterior del

telencéfalo, alcanzan las áreas hipotalámicas septal, preóptica y anterior en donde se establecen. Durante su migración, las neuronas GnRHérgicas elaboran procesos axonales que arriban a la eminencia media (edad embrionaria 14.5 días). La expresión del precursor de la GnRH en las neuronas GnRHérgicas se detecta a partir del día 11.5 de la gestación. (Knobil E y Neill JD, 1994).

### **Hormona Liberadora de Gonadotropinas**

#### **a) Síntesis**

Se ha identificado un solo gen para la GnRH<sub>1</sub> que posee cuatro exones. El gen contiene sitios de regulación en el extremo 5', dentro de los cuales destacan: el sitio AP-1, de regulación transcripcional para dímeros de fos:jun y jun:jun; el sitio para el receptor a estrógenos; el sitio para el receptor a progesterona y el sitio de elementos amplificadores hipotalámicos (Turgeon, 1996).

Estudios bioquímicos han revelado la existencia de variantes de la GnRH en individuos de la misma especie. Estas variantes constituyen así, una familia de decapeptidos estructuralmente similares cuyas funciones no han sido completamente estudiadas. Hasta el momento se han identificado y secuenciado siete péptidos diferentes de esta familia. Por otro lado, estos péptidos también se han identificado en diversos grupos de vertebrados, desde los agnatos hasta los mamíferos. En todas las formas de la GnRH los aminoácidos 1,2,4,9 y 10 se encuentran conservados. Estos residuos son importantes para la unión al receptor, y por tanto forman parte indispensable para la actividad biológica de la GnRH (Muske, 1993).

El producto de transcripción del gen es una proteína precursora de noventa y dos aminoácidos que contiene una secuencia formada por diez aminoácidos ubicados en el extremo amino-terminal, que corresponden a la GnRH madura. La secuencia restante, que se extiende hacia el extremo carboxilo terminal del precursor, corresponde a un péptido de cincuenta y seis aminoácidos denominado GAP, cuya función es aún tema de controversia (Figura 5).

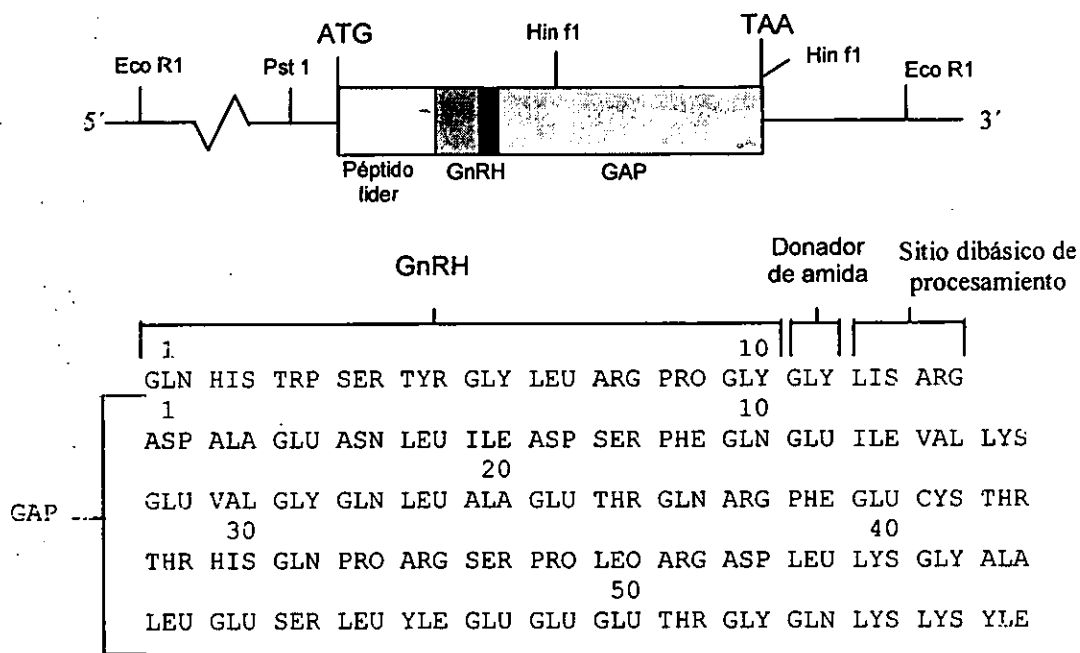


Figura 5 Estructura del gen y del péptido de la GnRH. En esta Figura se muestra un esquema del gene de la GnRH, las regiones que codifican para el péptido señal, la GnRH y el GAP. También se muestra la secuencia de aminoácidos de cada uno de ellos.

#### b) Liberación episódica de la GnRH

Una vez sintetizada, la GnRH es almacenada en gránulos secretorios y liberada de manera episódica con diversas frecuencias, entre las que destacan una rápida que

ocurre en el orden de minutos a horas (i.e., ultradiana) y otra de mayor amplitud pero de mucha menor frecuencia (i.e., infradiana), la que es responsable de la ovulación (Wierman *et al.*, 1995). Aunque no se conocen con certeza los mecanismos encargados de generar la actividad rítmica de las neuronas GnRHérgicas, se ha postulado la existencia de dos osciladores localizados en el hipotálamo mediobasal y en el área preóptica, responsables de inducir la actividad rítmica ultradiana e infradiana, respectivamente. En concordancia con esta idea, Knobil y colaboradores (1990) mostraron en registros electrofisiológicos en primates, que regiones vecinas (e.g., hipotálamo mediobasal) a las neuronas GnRHérgicas muestran una intensa actividad sincrónica altamente correlacionada con los episodios de liberación de la GnRH (Knobil, 1990). Así, es muy probable que el regulador maestro del eje reproductivo sea el generador de pulsos de GnRH.

Si bien los elementos constitutivos del generador de pulsos de GnRH existen desde edades tempranas del desarrollo, no es sino hasta la pubertad cuando éste se activa. Durante el desarrollo, se han observado tres fases en la activación del generador de pulsos. En la primera de ellas, las células que lo constituyen presentan asincronía debida a la inhibición tónica de las aferentes GABAérgicas. En la segunda, la inhibición decremента por la influencia de aferentes de norepinefrina y neuropéptido Y, lo que conduce a un aumento en la sincronización de la actividad secretoria de las células del generador. En la tercera fase, que

coincide con la pubertad, las células del generador se sincronizan del todo. En esta fase el GABA estimula y quizás sincroniza la secreción de GnRH.

Después de la pubertad, el sistema es regulado por diversos factores, dependiendo de la especie. Dentro de los factores que afectan a la reproducción se encuentran diferencias debidas al género, a la fase del ciclo reproductivo y a la época del año. Toda esta información se integra y confluye a las neuronas GnRHérgicas, a través de diversas aferencias. Estudios realizados en modelos *in vitro* han confirmado los efectos de muchos de los mediadores centrales descritos *in vivo*. Por ejemplo, el uso de neuronas GnRHérgicas inmortalizadas ha producido resultados sobre efectos activadores e inhibidores sobre la liberación y la regulación de la GnRH. Estos efectos son provocados después de la aplicación de catecolaminas (Jennes *et al.*, 1985; Leranth *et al.*, 1988; Martínez de la Escalera *et al.*, 1992 a y b; Segovia *et al.*, 1996), histamina (Noris *et al.*, 1995), GABA (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994; Masotto y Negro-Vilar, 1988), glutamato (Leranth *et al.*, 1988 y Leranth *et al.*, 1985 b; Jung *et al.*, 1998), óxido nítrico (Belsham *et al.*, 1996; Gobbetti y Zerani, 1998; Kohsaka *et al.*, 1999; Mahachoklertwattana *et al.*, 1994; Sortino *et al.*, 1994), neuropéptido Y (Li *et al.*, 1999; Kerrigan *et al.*, 1995), estradiol (Prevot *et al.*, 1999), y péptidos opiáceos (Thind *et al.*, 1988; Prevot *et al.*, 1998).

En términos generales, la modulación de la liberación de la GnRH por aminoácidos y aminas biogénicas es mediada por receptores metabotrópicos asociados a sistemas de segundos mensajeros (AMPC e IP<sub>3</sub>), así como ionotrópicos responsables de los cambios rápidos en la polarización celular.

### c) Regulación GABAérgica de la liberación de la GnRH

La iniciación de la pubertad en mamíferos depende de un aumento en la secreción de GnRH, producto de la actividad de las neuronas GnRHérgicas. Una vez que la actividad sincrónica y episódica de las neuronas GnRHérgicas se establece, la etapa funcional del eje reproductivo comienza. Como ya se ha mencionado con anterioridad esta actividad es regulada por afrentes de diversas naturalezas (excitadoras e inhibitoras) sobre las neuronas GnRHérgicas. El GABA afecta la secreción de GnRH a través de dos tipos de receptores, los GABA<sub>A</sub> (receptor ionotrópico-canal de cloro) y los GABA<sub>B</sub> (receptor metabotrópico, con siete dominios transmembranales)

Partiendo de estudios *in vivo* donde se observó por primera vez la participación de GABA en la regulación del eje reproductivo, descritos brevemente en la sección anterior, el papel de este neurotransmisor se ha estudiado profundamente. La posibilidad de la participación de GABA como un factor regulador de la liberación de la GnRH fue reforzada por experimentos que mostraron que la administración sistémica, la infusión intracerebro ventricular y la aplicación de GABA a explantes hipotalámicos, inducen la secreción de la GnRH (Ondo, 1974). Por otro lado, existen también estudios que sugieren que el GABA inhibe la secreción de la GnRH y en este efecto se ha reportado la participación de receptores GABA<sub>B</sub> (Lamberts *et al.*, 1983; Masotto y Negro-Vilar, 1987, Nikolarakis *et al.*, 1988; Akema y Kimura, 1992). Si bien los efectos descritos son a primera vista contradictorios, se sabe que el GABA actúa como neurotransmisor excitatorio en neuronas en desarrollo e

inhibitorio en neuronas maduras, debido a los cambios que sufre el potencial de equilibrio del cloro a lo largo de la vida neuronal (Moguilevsky *et al.*, 1991; Feleder *et al.*, 1996; Bourguignon *et al.*, 1997). Evidencia adicional que apoya el papel del GABA como factor regulador de la liberación de la GnRH proviene de estudios histológicos en los que se ha mostrado la presencia de terminales GABAérgicas sobre neuronas GnRHérgicas (Leranth *et al.*, 1985 a), y la existencia de receptores a GABA en éste último tipo neuronal (Jung *et al.*, 1998).

En años recientes se ha desarrollado un modelo de neuronas GnRHérgicas inmortalizadas (GT<sub>1</sub>) que ha facilitado la caracterización de las respuestas farmacológicas de las neuronas GnRHérgicas (Mellon *et al.*, 1990). Estas células guardan muchas de las propiedades fisiológicas, morfológicas (Weiner *et al.*, 1992) y electrofisiológicas (Bosma, 1993) de las neuronas GnRHérgicas nativas, y de ahí su valor experimental. Utilizando el modelo de neuronas GT<sub>1</sub> se ha mostrado que el GABA ejerce un efecto bifásico sobre la secreción de la GnRH, el cual consta de una fase estimulante rápida pero transitoria, seguida de una fase de inhibición tardía y tónica del proceso de liberación (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). El GABA induce un aumento rápido en la concentración de Ca<sup>+2</sup> intracelular ([Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>), mismo que se traduce en un efecto facilitador de la secreción de la GnRH (Hales *et al.*, 1994; Martínez de la Escalera *et al.*, 1994; Spergel *et al.*, 1995; King *et al.*, 1999). En las células GT<sub>1</sub>, así como en algunas otras células hipotalámicas, la primera fase de esta respuesta se debe al potencial de equilibrio del cloro, el cual es más positivo que el potencial de equilibrio de la membrana plasmática (Hales *et al.*, 1994; Cheng

*et al.*, 1995). Esta condición iónica provoca que, al activarse el receptor-canal GABA<sub>A</sub>, se induzca una corriente saliente de iones cloro, lo cual despolariza el potencial de la membrana y activa a los canales de Ca<sup>+2</sup> dependientes de voltaje. Además, una vez que cesa esta facilitación, se observa una inhibición de la liberación de la GnRH y de la [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>. Sin embargo este efecto inhibitorio tardío del GABA sobre la secreción de la GnRH ha sido poco estudiado. Existen algunas evidencias experimentales que apuntan también a la participación del receptor GABA<sub>A</sub> como mediador de esta fase.

#### d) Regulación por esteroides ováricos sobre neuronas GnRHérgicas

La retroalimentación ejercida por los esteroides gonadales, a nivel central, puede estar dada de manera directa o indirecta sobre las neuronas GnRHérgicas. En 1983, Pfaff y colaboradores (Shivers *et al.*, 1983) mostraron, utilizando técnicas de doble inmunohistoquímica en rebanadas de hipotálamo de ratón, que muy pocas neuronas GnRHérgicas expresan receptores para estrógenos. Estos datos frenaron por mucho tiempo las investigaciones sobre efectos directos de estrógenos en las neuronas GnRHérgicas, y parecía inútil buscar efectos en un sistema en donde uno de los elementos de la función fisiológica no está presente. No se consideró, por ejemplo, que los receptores a esteroides funcionan como factores de transcripción por lo que el número funcional de receptores por célula no necesita ser muy elevado. Además, la resolución de la técnica de inmunohistoquímica no es muy alta, por lo que el resultado negativo debió haber sido ponderado. También se debe considerar que en esa época se desconocía la existencia del receptor  $\beta$  para

estógenos.

Aunado a esta situación, otros estudios reforzaron la hipótesis de la acción indirecta, ya que mostraron la presencia de receptores a esteroides en neuronas dopaminérgicas, opioidérgicas y GABAérgicas, todas ellas aferentes de las neuronas GnRHérgicas, cuyos efectos modulan la función del eje reproductivo. Existen fuertes evidencias de que neuronas que contienen  $\beta$ -endorfinas son componentes integrales de la retroalimentación negativa por estrógenos dentro del eje reproductivo (Mansky *et al.*, 1982; Lamberts *et al.*, 1983). Al administrar el antagonista opioidérgico naloxona, se bloquea el efecto del estradiol sobre la retroalimentación negativa del eje y se puede adelantar el pico preovulatorio de LH en las mujeres. La activación por  $\beta$ -endorfinas del receptor a opioides  $\mu$  en células GnRHérgicas mimetiza la retroalimentación negativa de la liberación de la GnRH/LH y se ha visto que hiperpolariza directamente, y por lo tanto inhibe a las neuronas GnRHérgicas mediante la apertura de canales de  $K^+$  rectificantes (GIRK) (Kelly y Wagner, 1999). Toda esta evidencia no deja en duda el efecto indirecto de los esteroides gonadales sobre las neuronas GnRHérgicas.

Recientemente, el concepto de un componente directo de la retroalimentación esteroidea sobre las neuronas GnRHérgicas ha sido replanteado. Experimentos electrofisiológicos han mostrado que aplicaciones iontoforéticas de estradiol pueden alterar las respuestas neuronales en segundos (Moss *et al.*, 1997). Además, a raíz del desarrollo de una línea de neuronas GnRHérgicas inmortalizadas (GT<sub>1</sub>), evidencia adicional ha sido aportada. Tal es el caso de la presencia de sitios de

unión de alta y baja afinidad para progesterona (Karaviti y Angelides, 1993), estrógenos y andrógenos (Poletti *et al.*, 1994), así como para glucocorticoides (Chandran *et al.*, 1994). Además de la existencia de los elementos necesarios para la acción directa, se han empezado a reportar resultados sobre modificaciones funcionales por esteroides. Por ejemplo, Alonso-Solis y colaboradores en 1996 mostraron que el tratamiento con estradiol bloquea la formación de AMP cíclico inducido por norepinefrina a células GT<sub>1</sub>. El tratamiento secuencial con estradiol seguido por progesterona tiene el efecto contrario (Alonso-Solis *et al.*, 1996). Los receptores a esteroides (RE) que median este efecto pueden estar directamente acoplados, vía proteínas G (GPCR), a canales de K<sup>+</sup> (Kelly y Wagner, 1999). Además de esta vía, se ha descubierto que el estradiol puede incrementar de manera muy rápida la actividad de la proteína cinasa A (PKA), misma que tiene la capacidad de modular el acople de GPCR a sus efectores en todo el sistema nervioso central.

Así mismo, Kepa y colaboradores (1996) reportaron que la aplicación de progesterona a células en cultivo reprime la transcripción de la GnRH. La progesterona también modifica la frecuencia y la amplitud de los pulsos de liberación de la GnRH en presencia o ausencia de estrógenos (Kepa *et al.*, 1996).

Estos resultados apuntan a que además de la acción indirecta, que ha recibido un sólido apoyo experimental, los esteroides gonadales podrían ejercer una acción directa sobre las neuronas GnRHérgicas. El propósito de este trabajo es el de obtener evidencia experimental que apoye este postulado. Dada la importante

participación GABAérgica en el control del eje reproductivo, decidimos utilizar su efecto como monitor de la actividad de las neuronas GnRHérgicas, sobre el cual determinamos posibles efectos esteroideos.

### **Hipótesis**

Como se describe en la sección anterior, es claro que la retroalimentación por esteroides gonadales constituye uno de los reguladores más importantes de la función reproductiva. Esta retroalimentación se puede ejercer tanto de manera directa como indirecta. Debido a las observaciones de Pfaff y sus colaboradores y a que se detectaron receptores a esteroides en neuronas GABAérgicas, dopaminérgicas y opioidérgicas (todas ellas aferentes a las GnRHérgicas), se planteó que la retroalimentación de los esteroides, a nivel central, se ejerce de manera indirecta sobre las neuronas GnRHérgicas, a través de neuronas de diversas naturalezas. Esta postura ha recibido múltiples apoyos experimentales. En cambio, la participación de acciones directas no ha sido estudiada sino hasta muy recientemente, y en particular se ha replanteado a raíz del desarrollo de una línea inmortalizada de neuronas GnRHérgicas, en la cual se han generado resultados que la apoyan. Además, utilizando otros modelos experimentales se ha reavivado el interés de determinar la participación relativa de efectos directos mediados por receptores intracelulares y membranales.

Con base en todos estos antecedentes nos planteamos como hipótesis de trabajo que los esteroides gonadales podrían, además de ejercer los efectos indirectos conocidos, ejercer una acción directa sobre las neuronas GnRHérgicas.

## Objetivos

Con base en esta hipótesis, nos planteamos varios objetivos experimentales, basados todos ellos en las siguientes consideraciones:

Utilizamos como modelo experimental de neuronas GnRHérgicas a células GT<sub>1</sub> dadas sus siguientes características: poseen una morfología neuronal (Weiner *et al.*, 1992), expresan GnRH y sus precursores, y secretan grandes cantidades de GnRH de manera pulsátil espontáneamente (Mellon *et al.*, 1990; Krsmanovic *et al.*, 1992; Martínez de la Escalera *et al.*, 1992a). Además, el intervalo pulsátil para la liberación de GnRH en estas células es muy similar al reportado para la liberación de GnRH y LH in vivo. Las neuronas GT<sub>1</sub> poseen características electrofisiológicas similares a las observadas en cultivos primarios de neuronas hipotalámicas (Bosma, 1993), expresan canales de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y, al menos expresan cinco subtipos de canales de Ca<sup>2+</sup>, de los cuales el más común parece ser el canal tipo-R que es activado por ésteres de forbol (Inoue y Sperelakis, 1992). Estas células expresan receptores a GABA y responden a ese neurotransmisor con cambios importantes en el metabolismo del calcio (Jung *et al.*, 1998; Martínez de la Escalera *et al.*, 1994).

Empleamos como monitor de la función de estas células a la respuesta bien caracterizada a GABA. La razón fundamental es que como he mencionado anteriormente, el GABA tiene un papel fundamental sobre la reproducción, y su acción sobre las neuronas GnRHérgicas se conoce con bastante detalle en particular un efecto ionotrópico rápido, que resulta en cambios marcados del nivel intracelular de calcio. Dado que la liberación de GnRH es dependiente de calcio y

el método de medición de la  $[Ca^{+2}]_i$  tiene la ventaja de hacer mediciones en tiempo real, utilizamos este parámetro para resolver las preguntas planteadas en este proyecto.

Para las mediciones de calcio intracelular utilizamos INDO-1 y FURA-2 como indicadores de la  $[Ca^{+2}]_i$  ya que se trata de los fluoróforos mejor caracterizados y empleados.

Los tratamientos de esteroides gonadales que se plantean en el proyecto están dados con base en múltiples reportes en donde se ha documentado la regulación positiva del receptor a progesterona por efectos de estradiol. Esta regulación del estradiol se realiza en periodos largos de tiempo que permiten que se expresen más receptores a progesterona. Así, la incubación con estradiol es muy importante para poder observar respuestas a progesterona. Durante el presente proyecto utilizamos un paradigma convencional de tratamiento combinado.

Finalmente, utilizamos ionomicina como indicador de la eficiencia de la técnica. La ionomicina es un ionóforo de calcio, es decir, es una proteína que hace poros en la membrana, permitiendo así una entrada masiva de calcio a la célula de manera no regulada.

De esta manera, los objetivos puntuales del trabajo fueron los siguientes:

1. Evaluar los efectos de la aplicación de GABA sobre los transientes de calcio en neuronas GT<sub>1-7</sub>, utilizando los indicadores fluorescentes INDO-1 y FURA-2, y métodos de espectrofluorometría

2. Evaluar los efectos de la preincubación con estradiol sobre los transientes de calcio inducido por GABA en neuronas GT<sub>1-7</sub>, utilizando el indicador fluorescente INDO-1 y métodos de espectrofluorometría. Estos fueron comparados con los efectos de ionomicina.
3. Evaluar los efectos de la preincubación con progesterona sobre los transientes de calcio inducido por GABA y por ionomicina en neuronas GT<sub>1-7</sub>.
4. Evaluar los efectos de la co-preincubación con estradiol y progesterona sobre los transientes de calcio inducido por GABA en neuronas GT<sub>1-7</sub>.

## **Materiales y Métodos**

### **Cultivo de células**

Las células GT<sub>1-7</sub><sup>1</sup> se cultivaron en cajas de petri de 10 cm de diámetro (Costar Corporation, Cambridge, MA), con medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina-estreptomina y 0.3 mg/ml de glutamina (GIBCO BRL). Los cultivos se mantuvieron dentro de un incubador a temperatura constante (37°C) con alta humedad y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire. El medio fue cambiado cada tres días, y las células se subcultivaron al llegar a una confluencia del 80 al 90%. Esto se realizó mediante

---

<sup>1</sup> Debido a la escasa cantidad de neuronas secretoras de GnRH, y a que no se encuentran agrupadas en núcleos, ha sido muy difícil estudiar los mecanismos que modulan su actividad *in vivo*. Por estas razones, se han generado dos líneas celulares secretoras de GnRH (GT1 y GN) por tumorigénesis dirigida (Mellon *et al.*, 1990; Radovick *et al.*, 1991). Para obtener las línea GT, se construyó un gen híbrido que contiene la región reguladora del gen de la GnRH y la región codificadora del antígeno T del virus de simio 40 (SV40), el cual transforma a las células que lo expresan en tumorales. Este gen híbrido se inyectó en pronúcleos de cigotos fecundados de ratón, y éstos se transfirieron a los oviductos de ratonas pseudoembarazadas. Así, tres líneas

2. Evaluar los efectos de la preincubación con estradiol sobre los transientes de calcio inducido por GABA en neuronas GT<sub>1-7</sub>, utilizando el indicador fluorescente INDO-1 y métodos de espectrofluorometría. Estos fueron comparados con los efectos de ionomicina.
3. Evaluar los efectos de la preincubación con progesterona sobre los transientes de calcio inducido por GABA y por ionomicina en neuronas GT<sub>1-7</sub>.
4. Evaluar los efectos de la co-preincubación con estradiol y progesterona sobre los transientes de calcio inducido por GABA en neuronas GT<sub>1-7</sub>.

## **Materiales y Métodos**

### **Cultivo de células**

Las células GT<sub>1-7</sub><sup>1</sup> se cultivaron en cajas de petri de 10 cm de diámetro (Costar Corporation, Cambridge, MA), con medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina-estreptomina y 0.3 mg/ml de glutamina (GIBCO BRL). Los cultivos se mantuvieron dentro de un incubador a temperatura constante (37°C) con alta humedad y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire. El medio fue cambiado cada tres días, y las células se subcultivaron al llegar a una confluencia del 80 al 90%. Esto se realizó mediante

---

<sup>1</sup> Debido a la escasa cantidad de neuronas secretoras de GnRH, y a que no se encuentran agrupadas en núcleos, ha sido muy difícil estudiar los mecanismos que modulan su actividad *in vivo*. Por estas razones, se han generado dos líneas celulares secretoras de GnRH (GT1 y GN) por tumorigénesis dirigida (Mellon *et al.*, 1990; Radovick *et al.*, 1991). Para obtener las línea GT, se construyó un gen híbrido que contiene la región reguladora del gen de la GnRH y la región codificadora del antígeno T del virus de simio 40 (SV40), el cual transforma a las células que lo expresan en tumorales. Este gen híbrido se inyectó en pronúcleos de cigotos fecundados de ratón, y éstos se transfirieron a los oviductos de ratonas pseudoembarazadas. Así, tres líneas

una disociación con solución salina balanceada con tripsina al 0.05% y EDTA-4Na 0.53mM (GIBCO BRL), seguida de centrifugación a 800 rpm por 10 minutos en una centrífuga clínica. Una vez hecho esto, las células fueron resuspendidas y sembradas. Con el objeto de para evitar cualquier efecto debido a los esteroides del suero, el medio fue substituido tres días antes de realizar los experimentos por un medio definido (Opti-MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino tratado con carbón activado, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (P-S) y 0.3 mg/ml de glutamina (GIBCO BRL). Los tratamientos que se utilizaron para evaluar la modulación ejercida por esteroides fueron los siguientes: 1) estradiol (100nM) por 24 horas, 2) progesterona (20nM) por 6 horas y 3) estradiol por 18 horas y 6 horas de coincubación con estradiol y progesterona.

### **Determinación de la concentración de calcio intracelular**

#### **a) Incorporación del fluoróforo**

Los fluoróforos que se utilizaron fueron INDO-1 y FURA-2 (Figura 6). Estos se incorporan a la célula libremente, una vez dentro de la célula se esterifican. Este proceso impide que el fluoróforo pueda salir de la célula. El tiempo reportado en células GT para la incorporación del fluoróforo es de una hora y la concentración final de 2 $\mu$ M. Probamos estas condiciones y obtuvimos excelentes resultados.

#### **b) Células en suspensión**

---

clonales de neuronas GT1 (GT<sub>1-1</sub> GT<sub>1-3</sub> y GT<sub>1-7</sub>) se obtuvieron a partir de un tumor en el área preóptica hipotalámica.

Las células GT<sub>1-7</sub> cultivadas (90% de confluencia) se incubaron con 10 $\mu$ M de INDO-1/AM (Molecular Probes) diluido en Opti-MEM durante 60 minutos a 37°C, y bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, el fluoróforo no incorporado se eliminó mediante tres lavados realizados en un periodo de 30 a 45 minutos con una solución extracelular que contenía NaCl 145mM; KCl 5mM; MgCl<sub>2</sub> 2mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8mM; HEPES 1.5mM; glucosa 10mM, pH 7.2-7.4 (ajustado con NaOH). Las células se desprendieron de la caja utilizando una solución de tripsina al 0.05% y EDTA-4Na 0.53mM (GIBCO BRL), y se resuspendieron en 10 ml de solución extracelular (obteniéndose una solución de aproximadamente 10<sup>6</sup> células/ml). Las células en suspensión se mantuvieron en el incubador a 37°C de temperatura constante con alta humedad y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Se utilizó un mililitro de esta suspensión de células cargadas con INDO-1/AM para realizar cada uno de los experimentos de determinación de calcio intracelular. La suspensión se colocó en una cubeta de plástico dentro del espectrofluorómetro (Aminco-Bowman AB-2 Spectronic), con agitación continua.

#### c) Células en monocapa

En este caso, las células se cultivaron (5x10<sup>5</sup> células /cm<sup>2</sup>) sobre cubreobjetos cubiertos con gelatina, previamente lavados y esterilizados. Las células así cultivadas sobre cubreobjetos se mantuvieron estériles en cajas de petri con medio D-MEM suplementado con suero fetal bovino 10%, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina y 0.3 mg/ml de glutamina (GIBCO BRL), en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire. El medio de cultivo fue reemplazado dos días antes del

experimento por D-MEM suplementado con suero fetal bovino tratado con carbón activado, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina y 0.3 mg/ml de glutamina (GIBCO BRL). Las células fueron monitoreadas constantemente mediante el uso de un microscopio invertido con el objeto de determinar el grado de desarrollo neurítico en los cultivos. Cuando los procesos neuronales alcanzaron una longitud tal que les permitiese "tocar" a las células vecinas (80% de confluencia), se agregaron al medio 2 $\mu$ M de FURA-2/AM (Molecular Probes) disuelto en medio fresco, y se incubó durante 60 minutos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, los cubreobjetos se lavaron con Ringer durante 30 minutos y se colocaron en un soporte (Micron Systems, Sykesville, MD) ajustado a la cubeta de plástico con 1ml de Ringer (Stojilkovic *et al.*,1994). Los registros se realizaron en espectrofluorómetro antes mencionado.

## Resultados

### Estandarización del método fluorométrico

La primera fase del proyecto consistió en estandarizar el método de determinación de los cambios en los transitorios de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el laboratorio. Para ello, se utilizaron dos indicadores fluorescentes: INDO-1 y FURA-2 (Figura 6). El indicador INDO-1 se utilizó para las determinaciones realizadas en células suspendidas, mientras que en aquellas realizadas en monocapa se utilizó FURA-2. Primeramente estandarizamos las condiciones en suspensión de células ya que no contábamos con la infraestructura para realizarlo en monocapa. Por esta razón en este trabajo todos los resultados fueron obtenidos con INDO-1 y células en

experimento por D-MEM suplementado con suero fetal bovino tratado con carbón activado, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina y 0.3 mg/ml de glutamina (GIBCO BRL). Las células fueron monitoreadas constantemente mediante el uso de un microscopio invertido con el objeto de determinar el grado de desarrollo neurítico en los cultivos. Cuando los procesos neuronales alcanzaron una longitud tal que les permitiese "tocar" a las células vecinas (80% de confluencia), se agregaron al medio 2 $\mu$ M de FURA-2/AM (Molecular Probes) disuelto en medio fresco, y se incubó durante 60 minutos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, los cubreobjetos se lavaron con Ringer durante 30 minutos y se colocaron en un soporte (Micron Systems, Sykesville, MD) ajustado a la cubeta de plástico con 1ml de Ringer (Stojilkovic *et al.*,1994). Los registros se realizaron en espectrofluorómetro antes mencionado.

## Resultados

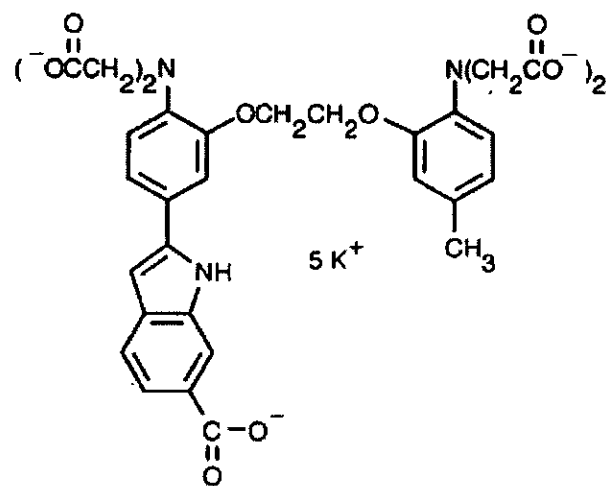
### Estandarización del método fluorométrico

La primera fase del proyecto consistió en estandarizar el método de determinación de los cambios en los transitorios de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el laboratorio. Para ello, se utilizaron dos indicadores fluorescentes: INDO-1 y FURA-2 (Figura 6). El indicador INDO-1 se utilizó para las determinaciones realizadas en células suspendidas, mientras que en aquellas realizadas en monocapa se utilizó FURA-2. Primeramente estandarizamos las condiciones en suspensión de células ya que no contábamos con la infraestructura para realizarlo en monocapa. Por esta razón en este trabajo todos los resultados fueron obtenidos con INDO-1 y células en

suspensión. Sin embargo, cuando el trabajo experimental estaba prácticamente concluido llegó el soporte y empezamos a estandarizar la técnica en monocapa y cambiamos el fluoróforo a FURA-2 pues al parecer el INDO-1 también censa cambios de pH. Por esta razón también se muestran algunos de los resultados preliminares con células en monocapa. Para establecer las condiciones óptimas de registro se tomó como base la técnica reportada por Stojilkovic *et. al.* (1994). Las condiciones finales de cada método se muestran en la tabla 1.

Utilizamos para medir la  $[Ca^{+2}]_i$  un espectrofluorómetro (Aminco.Bowman Series 2) que posee un dos monocromadores (uno de excitación y otro de emisión) y un fotomultiplicador, que permite amplificar la señal obtenida en tiempo real. Cada medición es capturada por un programa que permite posteriormente convertir fluorescencia en  $[Ca^{+2}]_i$ . Antes de cada registro de la  $[Ca^{+2}]_i$  se obtuvieron los espectros de absorción y de emisión correspondientes para cada fluoróforo. Con esto, se pudo verificar si las células captaron el indicador de manera adecuada. Para INDO-1 se midió la fluorescencia emitida a 410 y a 485nm, con una longitud de onda de excitación de 349nm (Figura 7).. Para FURA-2 se midió la fluorescencia emitida a 510 nm, con dos longitudes de onda de excitación de 300-400 nm (Figura 8).

### INDO-1 (AM)



### FURA-2 (AM)

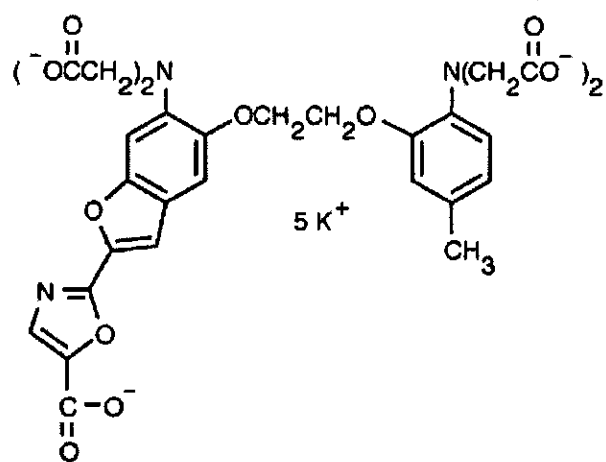
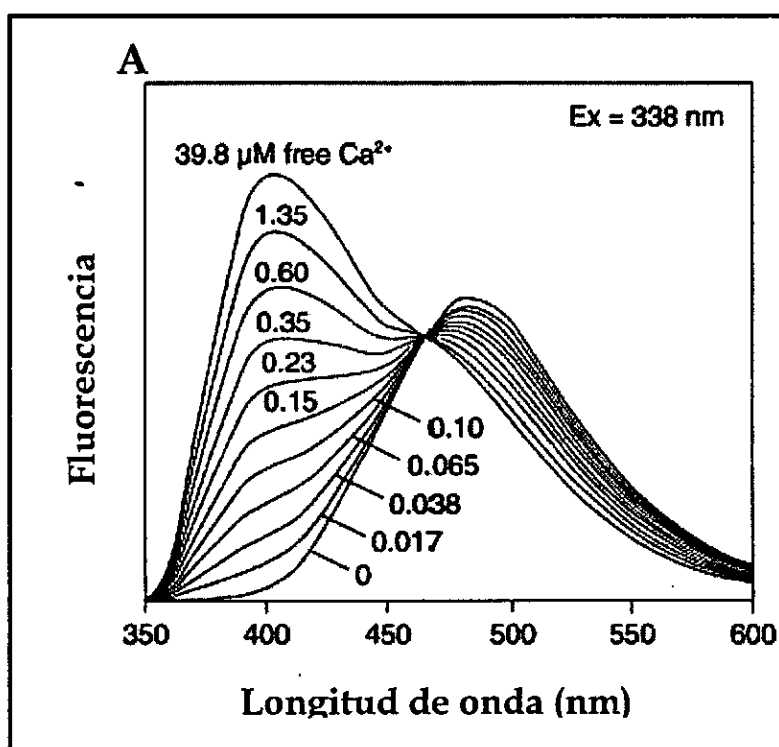


Figura 6. Estructuras del INDO-1-AM y del FURA-2-AM Estructura de la sal de pentapotasio de INDO-1, cuya fórmula molecular es  $C_{32}H_{26}K_5N_3O_{12}$  y peso molecular es 840.06 Estructura de la sal de potasio de FURA-2, cuya fórmula molecular es  $C_{29}H_{22}N_3Na_5O_{14}$  y peso molecular es 751.45 (Tomado del catálogo de Molecular Probes)

Tabla 1. Especificaciones de los métodos para medir la  $[Ca^{2+}]_i$  con células en suspensión y con células en monocapa, con INDO-1 y FURA-2, respectivamente.

| Características                        | Células en suspensión                                                                        | Células en monocapa                                                                    |
|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Fluoróforo                             | INDO-1                                                                                       | FURA-2                                                                                 |
| Medio de cultivo                       | Opti-MEM<br>Suplementado con 10% SFB<br>Penicilina-Estreptomicina<br>5ml<br>L-Glutamina 5 ml | D-MEM<br>Suplementado con 10% SFB<br>Penicilina-Estreptomicina 5ml<br>L-Glutamina 5 ml |
| Tiempo de incubación con el fluoróforo | 30 minutos                                                                                   | 1 hora                                                                                 |
| Tiempo de lavado                       | 30 minutos con medio fresco                                                                  | 30 minutos con medio fresco                                                            |
|                                        | Tripsinizar, centrifugar 5' a 800rpm y resuspender en 3ml de Ringer                          | Poner en el soporte con perfusión constante                                            |
| Espectros                              | Emisión 410 y 485 nm<br>Excitación 350 nm                                                    | Emisión 510 nm<br>Excitación 340 y 380 nm                                              |
|                                        | Leer en el espectrofluorómetro                                                               | Leer en el espectrofluorómetro                                                         |
| Calibración                            | Para obtener el máximo de fluorescencia se usó tritón                                        | Se perfunde una solución sin calcio, se deja en una solución                           |

|  |                                                                     |                                                                                                                                                               |
|--|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | 10% y para obtener el mínimo de fluorescencia se utilizó EGTA 0.5mM | de ionomicina 1 $\mu$ M para obtener el máximo de fluorescencia y con una solución de ionomicina 1 $\mu$ M-EGTA 0.5mM para obtener el mínimo de fluorescencia |
|--|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|



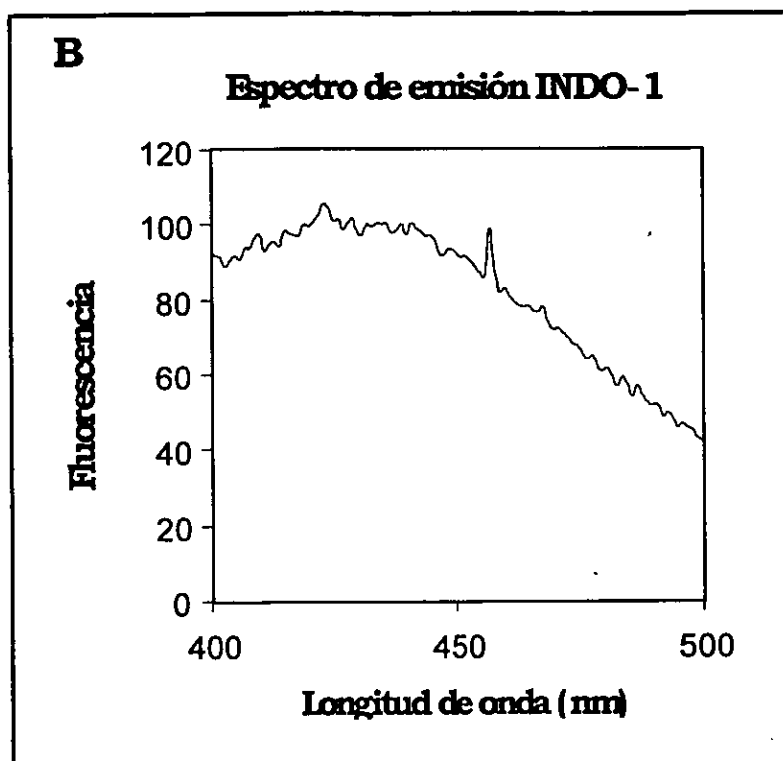
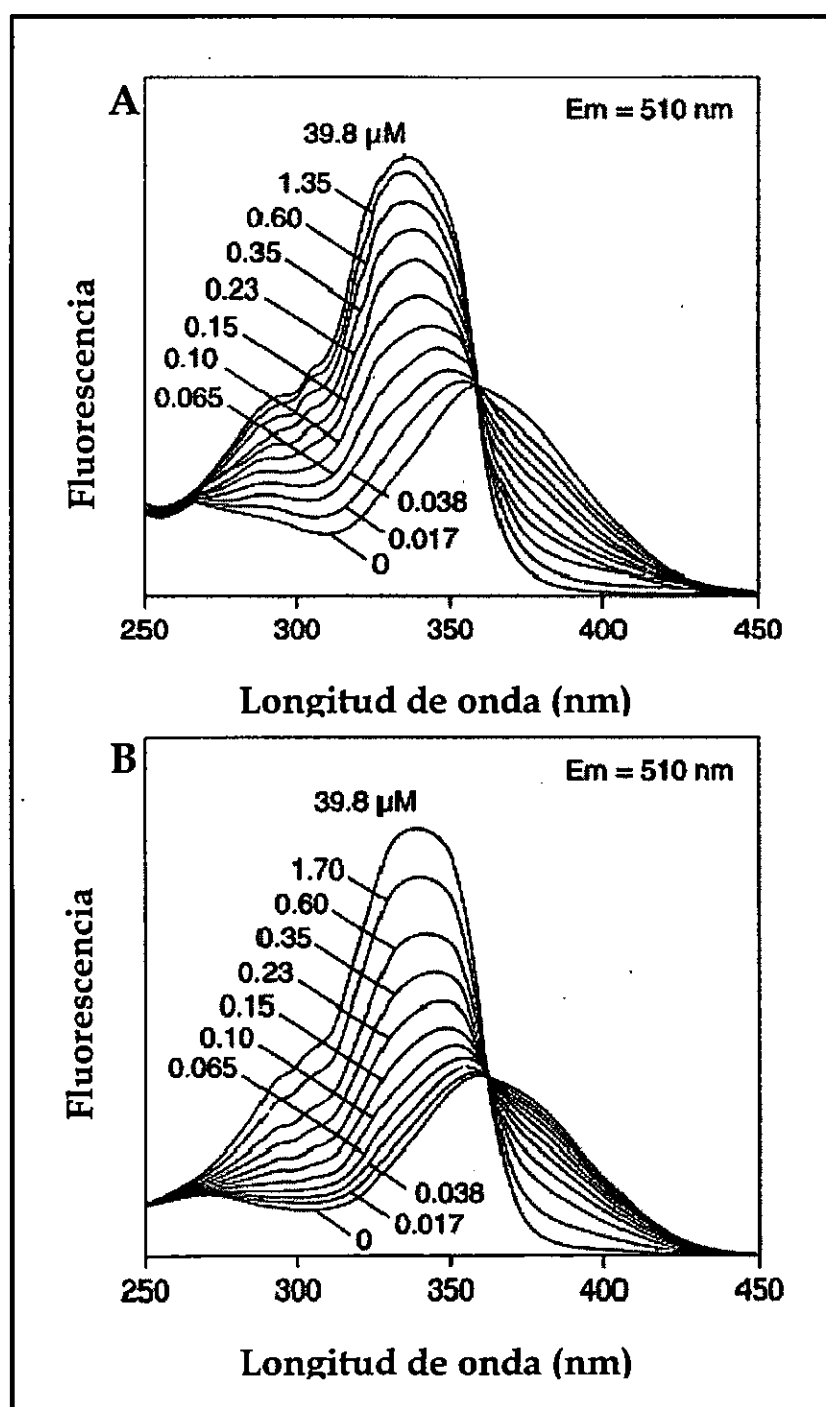


Figure 7. Espectros de emisión del INDO-1. A) Espectro de emisión de INDO-1 en una solución que contiene de cero a  $39.8 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  libre (Tomado del catálogo de Molecular Probes) B) Espectro de emisión de INDO-1 obtenido en una suspensión de células  $\text{GT}_{1-7}$

Los registros se obtuvieron midiendo la fluorescencia de emisión para INDO-1 o de excitación para FURA-2 cada segundo, en tiempo real. Dado que cada fluoróforo nos proporciona dos registros, correspondientes a cada longitud de onda, el programa del espectrofluoróforo obtiene un tercero que es el cociente de ambos. Es importante mencionar que los registros de las longitudes de onda deben formar imágenes especulares cuando se registran cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Este hecho apoya que el registro no posee artificios. Para cada registro se tomó la basal de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante 100 segundos y posteriormente, se aplicó GABA o Ionomicina, hasta obtener una respuesta máxima. Una vez obtenida la respuesta se procedió a

calibrar el experimento, con el objeto de convertir los cambios en fluorescencia a cambios en la  $[Ca^{+2}]_i$  (Figuras 9 y 10). Para el caso de las células en suspensión, la calibración se realizó midiendo la fluorescencia máxima obtenida a partir de un lisado de células con una solución de tritón al 10% y la fluorescencia mínima consecutiva al quelado del calcio con una solución de EGTA 5mM (ver tabla 1).



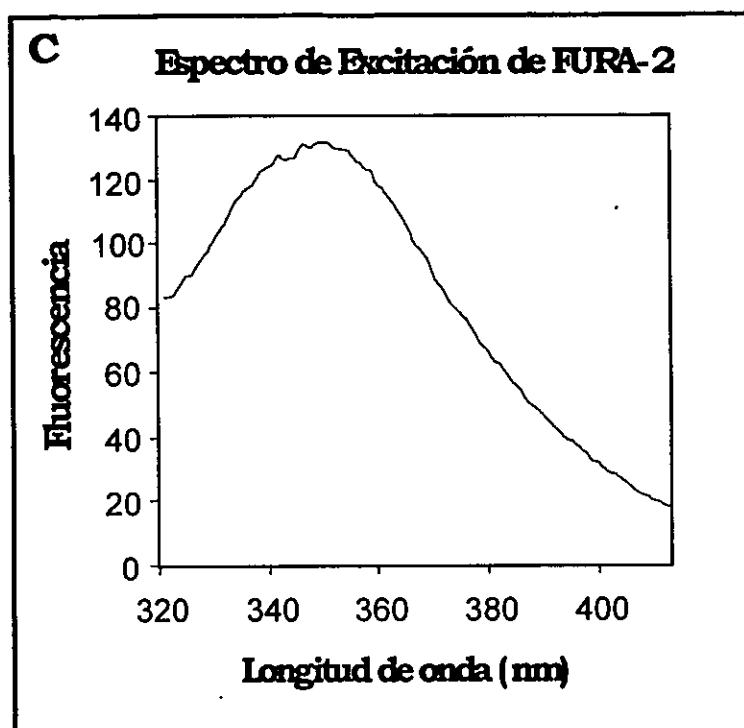


Figura 8. Espectro de excitación del FURA-2: A) FURA-2 y B) bis-FURA-2 en una solución que contiene de cero a  $39.8 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  libre (Tomado del catálogo de Molecular Probes). C) Espectro de excitación de FURA-2 obtenido en una suspensión de células  $\text{GT}_{1.7}$

De los registros podemos obtener la información necesaria para convertir la fluorescencia en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , como mencionamos anteriormente el equipo posee un programa que calcula la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediante la fórmula:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\min} / R_{\max} - R)] (Sf2/Sb2)$$

en donde  $K_d$  es la constante de disociación, una medida de afinidad de la sonda para el ion. La  $K_d$  reportada para FURA-2 es de 225 y para INDO-1 es 150.  $R$  corresponde al cociente entre la fluorescencia obtenida de las dos longitudes de onda de emisión o excitación, dependiendo del fluoróforo.  $R_{\min}$  (fluorescencia del ion libre) es la señal de la longitud de onda 1, es decir la fluorescencia del ion libre

en una longitud de onda 1 entre la fluorescencia de la longitud de onda 2, también con el ion libre.  $R_{max}$  (fluorescencia del ion unido) es la señal de la longitud de onda 1, es decir la fluorescencia del ion unido en una longitud de onda 1 entre la fluorescencia de la longitud de onda 2, también con el ion unido.  $S_{fb}/S_{b2}$  Es el radio de la señal en la longitud de onda 2 del fluoróforo libre del ion entre la señal del fluoróforo unido al ion.

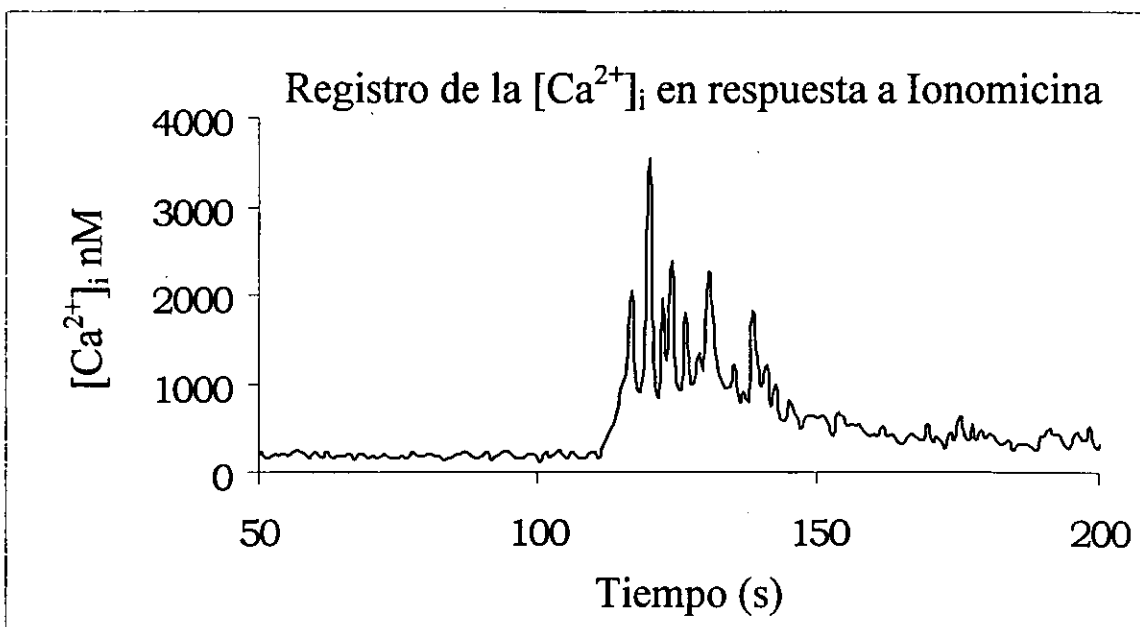
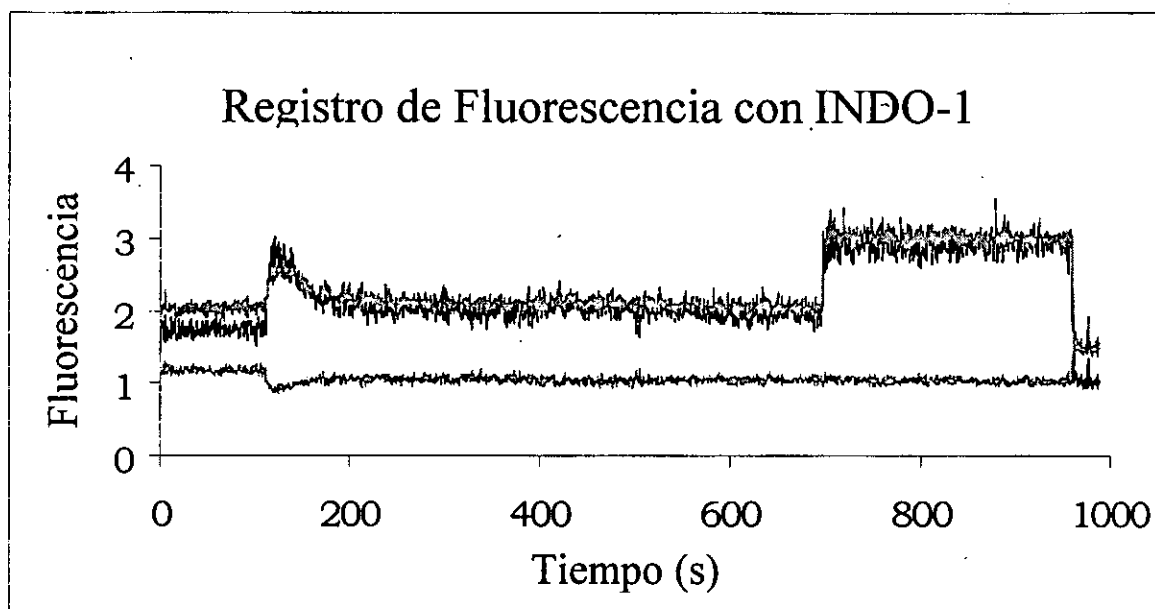


Figura 9. Registro de la  $[Ca^{2+}]_i$  en suspensiones de células GT<sub>1-7</sub>, utilizando INDO-1, en respuesta a Ionomicina. En la parte superior se ejemplifica un registro típico de medición de la  $[Ca^{2+}]_i$  con su calibración correspondiente. En este registro se muestra el cambio en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a Ionomicina 100nM (120 s), en tiempo real. Se pueden observar los registros de las dos longitudes de onda de emisión, en imágenes especulares, así como el cociente de los mismos. En la parte inferior se muestra la conversión del registro descrito en el párrafo anterior a la  $[Ca^{2+}]_i$  (nM).

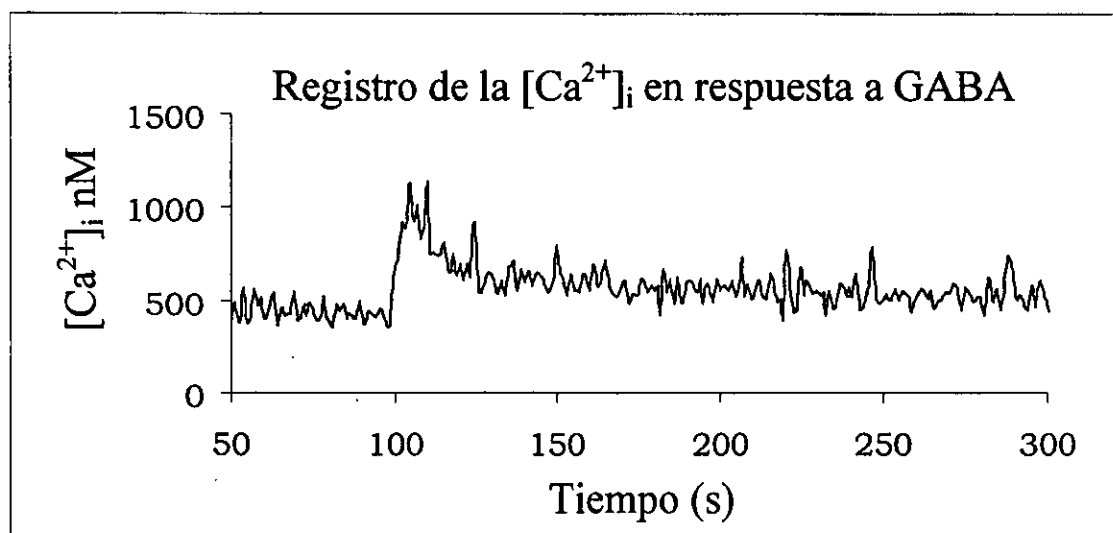
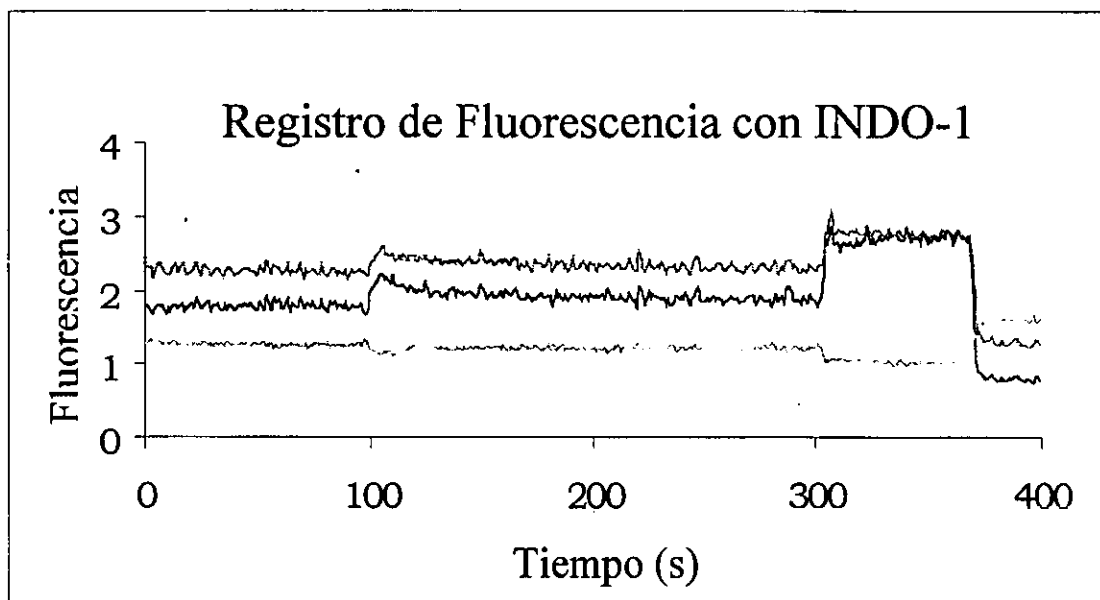


Figura 10.- Registro de la  $[Ca^{2+}]_i$  en suspensiones de células GT<sub>1-7</sub>, utilizando INDO-1, en respuesta a GABA. En la parte superior se ejemplifica un registro típico de medición de la  $[Ca^{2+}]_i$  con su calibración correspondiente. En este registro se muestra el cambio en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a GABA 100uM (100 s), en tiempo real. Se pueden observar los registros de las dos longitudes de onda de emisión, en imágenes especulares, así como el cociente de los mismos. En la parte inferior se muestra la conversión del registro descrito en el párrafo anterior a calcio intracelular (nM).

En el caso de las monocapas, la calibración se realizó midiendo la fluorescencia máxima después de la aplicación de ionomicina 1μM. El valor de la fluorescencia mínima se obtuvo aplicando una solución de ionomicina 1μM-EGTA 0.5mM. La concentración de calcio se calculó mediante la aplicación de una fórmula equivalente a la descrita anteriormente, substituyendo los valores correspondientes al FURA-2.

#### **Efectos de ionomicina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en células GT<sub>1-7</sub>.**

Con el objeto de validar si el procedimiento utilizado para la medición de la  $[Ca^{2+}]_i$ , discrimina entre diferentes niveles de la  $[Ca^{2+}]_i$ , empleamos ionomicina a distintas dosis. Se tomó la basal de la  $[Ca^{2+}]_i$  por 100 segundos en las suspensiones de células GT<sub>1-7</sub> y posteriormente se trataron con ionomicina por 60 segundos. En la Figura 11 se ilustran los resultados, mismos que muestran un incremento diferencial y progresivo de la  $[Ca^{2+}]_i$  con respecto a la concentración basal en relación con la dosis de ionomicina administrada, en un rango de 1nM hasta 1mM. La primera columna de cada grupo representa la  $[Ca^{2+}]_i$  inmediatamente antes de

la administración de ionomicina (basal ó B), mientras que la segunda se refiere al valor máximo alcanzado después de la administración de ionomicina (I). En el caso de la dosis más pequeña de ionomicina (1nM), la  $[Ca^{+2}]_i$  se elevó de un valor basal de 279nM hasta un valor máximo de 955nM. Esto corresponde a un aumento del 242%. Por su parte para la dosis de 10nM, la  $[Ca^{+2}]_i$  se elevó de un valor basal de 300nM hasta un valor máximo de 1.917 $\mu$ M, es decir un aumento del 539%. Para el caso de 100nM, el aumento neto fue de 2.5  $\mu$ M, de 335nM a 2.836 $\mu$ M, que en porcentaje es un aumento del 746%. Para la dosis más alta (1 $\mu$ M), el valor basal de la  $[Ca^{+2}]_i$  fue de 293nM y el máximo de 3.917 $\mu$ M. En este caso el aumento fue del 1236%. Estas determinaciones se realizaron al pico máximo de respuesta en un número muy importante de casos (entre 7 y 28, dependiendo del grupo), por lo que permiten concluir que el sistema utilizado discrimina entre efectos diferenciales en el aumento de la  $[Ca^{+2}]_i$ . Esto nos dio la confianza necesaria para utilizar este método como monitor en todos los experimentos posteriores realizados durante este trabajo.

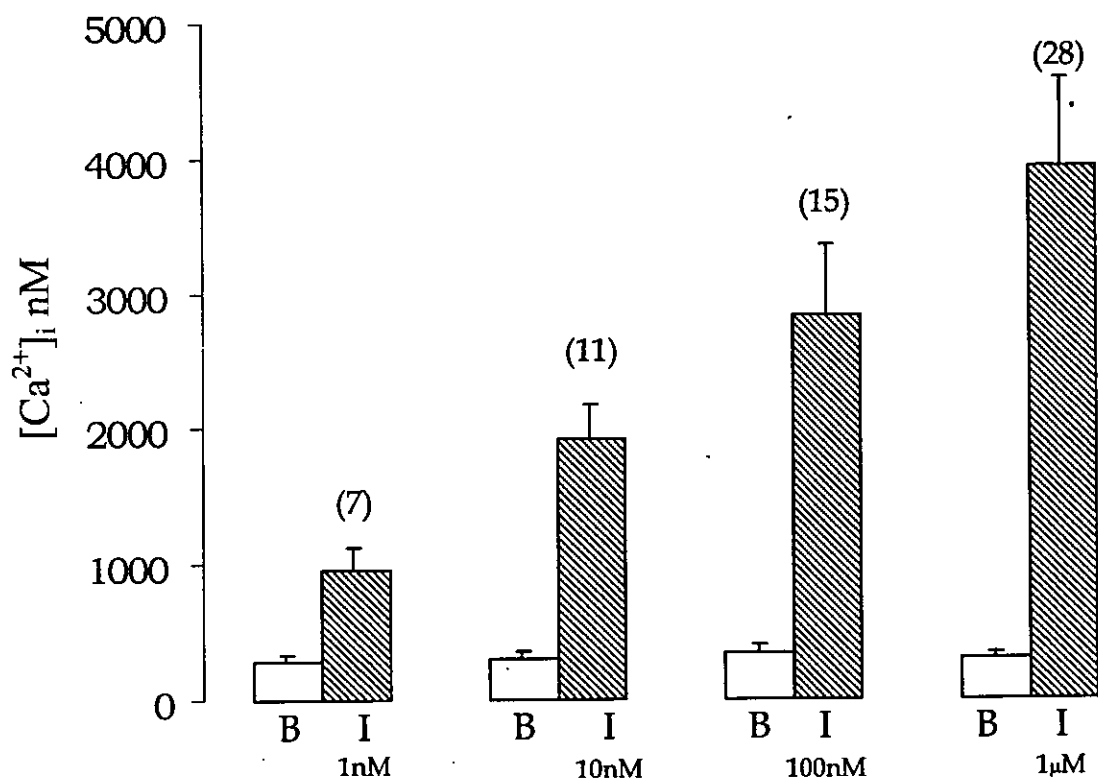


Figura 11.- Relación dosis-respuesta del efecto evocado por ionomicina. Cambio de la  $[Ca^{2+}]_i$  en células GT<sub>1-7</sub> en suspensión, en respuesta a dosis crecientes de ionomicina. Cada barra blanca representa el promedio de los valores basales (B) de la  $[Ca^{2+}]_i$  y las barras achuradas el promedio de las respuestas máximas consecutivas a la administración de ionomicina (I), en dosis de 1nM hasta 1μM, como se indica en la parte inferior de cada grupo. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. El número de casos por grupos se señala arriba de cada barra entre paréntesis

#### Determinación de los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en células GT<sub>1-7</sub> consecutivas a la administración de GABA

Con el propósito de establecer las concentraciones efectivas de GABA para inducir cambios claros en la  $[Ca^{2+}]_i$  procedimos a tratar suspensiones de células GT<sub>1-7</sub> con

dosis crecientes de GABA, desde  $1\mu\text{M}$  hasta  $1\text{mM}$  por 60 segundos. Al igual que en el grupo experimental anterior, se tomó la basal de la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  por 100 segundos. En la Figura 12 se ilustran de manera pareada el promedio de los valores basales previos a la administración de GABA junto con los promedios de los valores máximos observados en la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  en respuesta al GABA. La primera columna de cada grupo representa la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  inmediatamente antes de la administración de GABA (B), mientras que la segunda se refiere al valor máximo alcanzado después de la administración de GABA (G). En el caso de la dosis de  $1\mu\text{M}$ , la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  se elevó de un valor basal de  $376\text{nM}$  hasta un valor máximo de  $697\text{nM}$ . Esto corresponde a un aumento del 85%. En el caso de la dosis de  $10\mu\text{M}$ , la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  se elevó de un valor basal de  $365\text{nM}$  hasta un valor máximo de  $941\text{nM}$ , es decir un aumento del 157%. Para el caso de  $100\mu\text{M}$ , el valor basal fue de  $451\text{nM}$  hasta  $1.098\mu\text{M}$ , que en porcentaje es un aumento del 143%. Para la dosis más alta ( $1\text{mM}$ ), el valor basal de la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  fue de  $367\text{nM}$  y el máximo de  $796\text{nM}$ . En este caso el aumento fue del 116%. Estos datos muestran que no existe una clara relación dosis-respuesta al GABA en el rango de dosis utilizadas, si bien la más pequeña de éstas produjo un aumento que no fue estadísticamente significativo, las otras tres sí lo fueron. A partir de estas observaciones, decidimos emplear tres de estas dosis en un experimento adicional que se describe más adelante, en el cual medimos la modulación esteroidea de la respuesta a GABA. Este resultado no nos inspiró la confianza suficiente para descartar a todas menos una de las dosis de GABA.

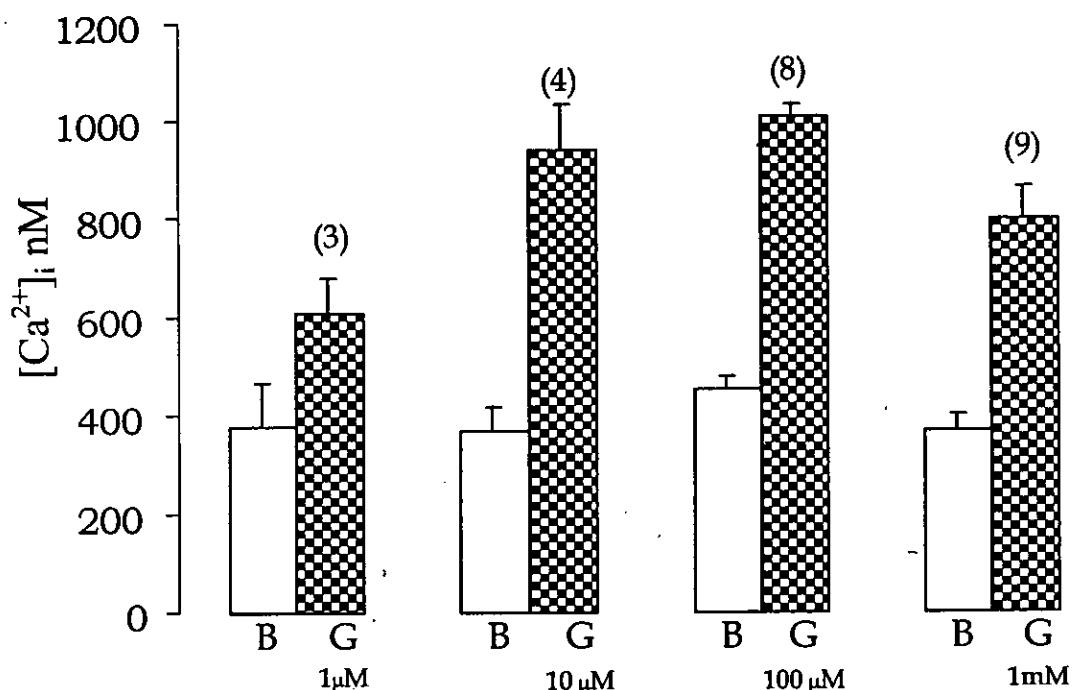


Figura 12.- Relación dosis-respuesta del efecto evocado por GABA. Cambio de la  $[Ca^{2+}]_i$  en células GT<sub>1-7</sub> en suspensión, en respuesta a dosis crecientes de GABA. Cada barra blanca representa el promedio de los valores basales (B) de la  $[Ca^{2+}]_i$  y las barras cuadriculadas el promedio de las respuestas máximas consecutivas a la administración de GABA (G), en dosis de 1  $\mu$ M hasta 1 mM, como se indica en la parte inferior de cada grupo. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. El número de casos por grupos se señala arriba de cada barra entre paréntesis

#### Modulación por 17 $\beta$ -estradiol de las respuestas en la $[Ca^{2+}]_i$ generadas por Ionomicina, en células GT<sub>1-7</sub>, preincubadas con esteroides

Con el objeto de determinar si una respuesta inespecífica en la  $[Ca^{2+}]_i$  es modulada por el pretratamiento con 17 $\beta$ -estradiol, incubamos células GT<sub>1-7</sub> por 24 horas con estradiol (100 nM). A continuación las células fueron cargadas con el indicador fluorescente INDO1-AM y registradas como se describió anteriormente. La

administración de tres distintas dosis de ionomicina se comparan en forma pareada entre suspensiones pretratadas con estradiol y suspensiones control, a las que sólo se les administró el vehículo (etanol). Nuevamente se agrupan de entre 5 y 28 determinaciones por grupo, para lo cual comparamos el valor basal de la  $[Ca^{+2}]_i$  previo a la infusión de ionomicina con el valor máximo de la  $[Ca^{+2}]_i$  en respuesta a la misma. Las dosis de ionomicina utilizadas fueron 10nM, 100nM y 1 $\mu$ M. Los resultados se muestran en la Figura 13. Para la dosis más pequeña (10nM) la  $[Ca^{+2}]_i$  se elevó en suspensiones no tratadas con estradiol de un valor basal de 300nM hasta un valor máximo de 1.917 $\mu$ M. Esto corresponde a un aumento del 536%. La misma dosis elevó la  $[Ca^{+2}]_i$  de un valor basal de 478nM hasta un valor máximo de 951nM, es decir un aumento del 98% en la suspensión con pretratamiento de estradiol (100nM) por 24 horas. Es decir, el pretratamiento con estradiol disminuyó la respuesta celular a la ionomicina en aproximadamente un 100%. En el caso de la administración de una dosis de ionomicina de 100nM a células no tratadas con estradiol, la  $[Ca^{+2}]_i$  se elevó de un valor basal de 335nM hasta un valor máximo de 2.836 $\mu$ M (un aumento del 746%). En el grupo pretratado con estradiol (100nM) por 24 horas el cambio neto de la  $[Ca^{+2}]_i$  fue de 1.154 $\mu$ M, es decir un aumento del 375%. Como en el caso anterior, al comparar los grupos control y tratado con estradiol obtuvimos una disminución en la amplitud de la respuesta de aproximadamente un 94% por efecto del estradiol. Para la dosis de ionomicina más alta utilizada (1 $\mu$ M), en el control el valor basal de la  $[Ca^{+2}]_i$  fue de 293nM y el máximo de 3.9 $\mu$ M (un aumento del 1236%). Con el pretratamiento con

estradiol el cambio en la  $[Ca^{2+}]_i$  entre el basal y el tratamiento con ionomicina fue de  $3\mu M$ , es decir un aumento del 982%. Comparando ambos grupos obtuvimos que el estradiol disminuyó la respuesta a ionomicina en aproximadamente un 15%. En todos los casos el pretratamiento con estradiol disminuyó la respuesta a ionomicina, no se alcanza la respuesta máxima obtenida sólo con ionomicina. Sin embargo, la  $[Ca^{2+}]_i$  basal no fue alterada por el pretratamiento con estradiol. Su efecto sólo se manifestó al exponer a las células a la acción de la ionomicina. El mecanismo de esta disminución no se conoce, si bien, estos datos sugieren que posiblemente exista una modificación en la permeabilidad de la membrana en la células pretradas con estradiol, que se pone de manifiesto al exponerlas a ionomicina.

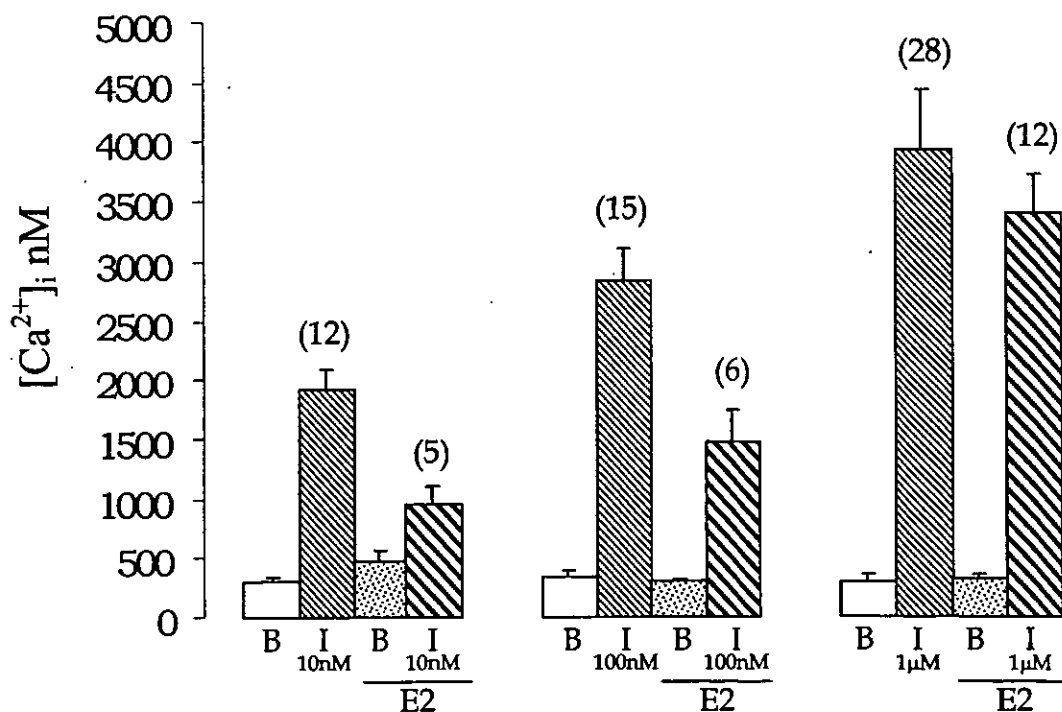


Figura 13.- Efecto del  $17\beta$ -estradiol sobre la respuesta de  $[Ca^{+2}]_i$  inducida por Ionomicina. Efecto de la preincubación por 24 horas con estradiol (100nM) sobre los cambios en la  $[Ca^{+2}]_i$  en células GT1-7 en suspensión inducidos por dosis crecientes de ionomicina. Cada barra blanca representa el promedio de los valores basales (B) de la  $[Ca^{+2}]_i$ ; las barras achuradas el promedio de las respuestas máximas consecutivas a la administración de ionomicina (I), en dosis de 10nM, 100nM y 1 $\mu$ M; las barras punteadas representan las basales en células pretratadas con estradiol (B) y las barras achuradas oscuras representan las respuestas a ionomicina en células pretratadas con estradiol (I), como se indica en la parte inferior de cada grupo. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. El número de casos por grupos se señala arriba de cada barra entre paréntesis.

#### **Modulación por $17\beta$ -estradiol de las respuestas en la $[Ca^{+2}]_i$ generadas por GABA, en células GT<sub>1-7</sub>, preincubadas con esteroides**

En el experimento de la Figura 12, no encontramos una clara relación entre la dosis de GABA y la magnitud de la respuesta. Como el objetivo fundamental del trabajo fue el de determinar si existe una modulación por esteroides ováricos sobre la respuesta de la  $[Ca^{+2}]_i$  a GABA, decidimos realizar un experimento piloto adicional utilizando nuevamente varias dosis de GABA (1 $\mu$ M, 100 $\mu$ M y 1mM) y ver sobre ellas el efecto exclusivamente del estradiol (100nM). Como se observa en la Figura 14, nuevamente no se observa una clara relación dosis-efecto del GABA sobre la  $[Ca^{+2}]_i$ . Sin embargo, nuevamente el GABA produjo aumentos significativos sobre la  $[Ca^{+2}]_i$  sólo a dosis de 100 $\mu$ M y 1mM. El pretratamiento con estradiol, no produjo cambios en la respuesta a GABA. En los grupos tratados con 100 $\mu$ M de GABA, los cambios entre la  $[Ca^{+2}]_i$  basal y estimulado fue de aproximadamente 123% en células no tratadas y 140% en la pretratada con estradiol. De igual forma en las

células estimuladas con 1mM de GABA, los efectos fueron del 116% y 109% en células no tratadas y pretratadas con estradiol, respectivamente. Así, a diferencia del resultado del experimento anterior, donde el tratamiento con estradiol afectó la respuesta a ionomicina, en este caso es claro que el tratamiento con estradiol no afecta la respuesta de aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por GABA. Dado que los resultados más claros en respuesta a GABA fueron los obtenidos con la dosis de 1mM, decidimos tomarla como base para realizar los experimentos con los diversos esquemas de pretratamiento con esteroides gonadales que se describen a continuación.

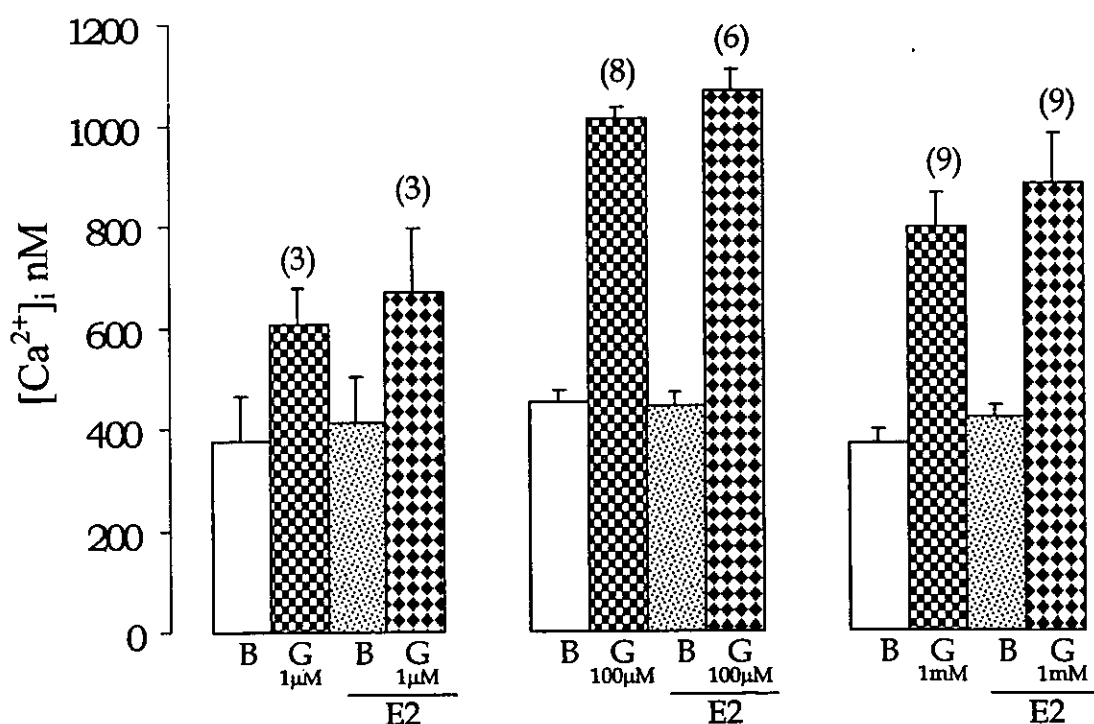


Figura 14. Efecto de 17β-estradiol por 24 horas sobre la respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por GABA. Efecto de la preincubación con estradiol (100nM) sobre los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en células GT1-7 en

suspensión inducidos por dosis crecientes de GABA. Cada barra blanca representa el promedio de los valores basales (B) de la  $[Ca^{+2}]_i$ ; las barras cuadriculadas el promedio de las respuestas máximas consecutivas a la administración de GABA (G), en dosis de  $1\mu M$ ,  $100\mu M$  y  $1mM$ ; las barras punteadas representan las basales en células pretratadas con estradiol (B) y las barras con rombos representan a células pretratadas con estradiol (G), como se indica en la parte inferior de cada grupo. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. El número de casos por grupos se señala arriba de cada barra entre paréntesis.

### **Modulación por $17\beta$ -estradiol, progesterona y el tratamiento combinado de ambos de las respuestas en la $[Ca^{+2}]_i$ generadas por GABA, en células GT<sub>1-7</sub>, preincubadas con esteroides**

Con el propósito de estudiar los efectos moduladores de los esteroides gonadales sobre la respuesta a GABA en células GT<sub>1-7</sub>, se diseñaron los siguientes experimentos tomando en cuenta los resultados obtenidos en los grupos piloto descritos previamente. Para ello, realizamos cuatro grupos experimentales. El grupo testigo fue tratado con  $1mM$  de GABA posterior al tratamiento por 24 horas con vehículo. El segundo grupo correspondió a células pretratados con estradiol ( $100nM$ ) por 24 horas, antes de la aplicación de GABA  $1mM$ . El tercer grupo correspondió a células pretratados con progesterona ( $20nM$ ) por 6 horas, antes de la aplicación de GABA  $1mM$ . Finalmente, el cuarto grupo experimental correspondió a células pretratados con estradiol( $100nM$ ) por 24 horas, de las cuales las seis últimas también reciben progesterona ( $20nM$ ) y posteriormente se probó el efecto de aplicar GABA  $1mM$ .

En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos con este diseño experimental. Se muestra primeramente la respuesta a GABA. En este caso la  $[Ca^{+2}]_i$  se elevó de un valor basal de 367nM hasta un valor máximo de 796nM. Esto corresponde a un aumento del 116%. Como ya se reportó en la Figura 14 y 16, el pretratamiento con estradiol no modificó la respuesta de las células GT<sub>1-7</sub> al GABA. En este caso la  $[Ca^{+2}]_i$  se elevó de un valor basal de 420nM hasta un valor máximo de 880nM, es decir un aumento del 109%. En contraste con la falta de efecto del estradiol, la progesterona si alteró las respuestas al GABA. Mientras que la respuesta a GABA en las células no tratadas fue de 116%, el tratamiento con progesterona (20nM) por seis horas disminuyó esta respuesta (basal 412nM, valor máximo de 554nM, un aumento del 34%). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ) con respecto al grupo control. Este porcentaje es casi la mitad del efecto obtenido con GABA en células no tratadas. Finalmente en el caso del pretratamiento secuencial con estradiol por 24 horas y progesterona en las últimas 6, el valor basal de la  $[Ca^{+2}]_i$  fue de 485nM y el máximo estimulado por GABA de 1.065 $\mu$ M. En este caso el aumento fue del 119%. Este porcentaje es significativamente diferente al grupo tratado sólo con progesterona ( $p>0.05$ ), pero no al grupo control. Es decir, el pretratamiento con estradiol bloqueó el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la respuesta de las células GT<sub>1-7</sub> al GABA.

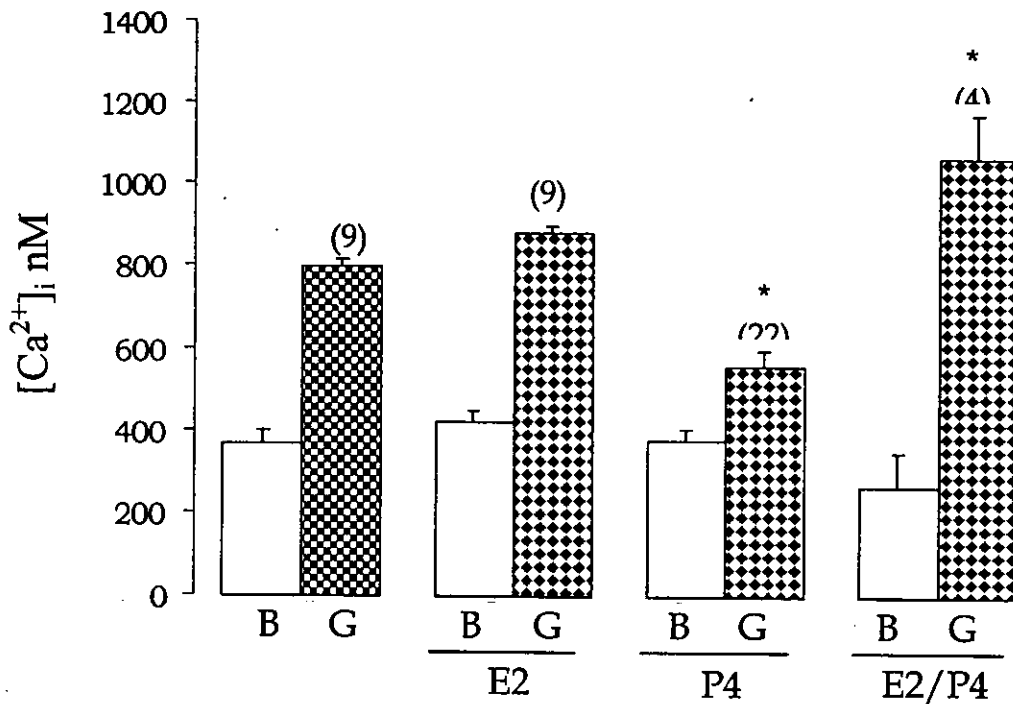


Figura 15.- Efecto del 17 $\beta$ -estradiol, progesterona o ambos sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  modulada por GABA. Modulación de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por GABA 1mM en suspensiones de células GT<sub>1</sub>, pretratadas con esteroides ováricos. Cada barra blanca representa el promedio de los valores basales (B) de la  $[Ca^{2+}]_i$ ; las barras cuadrículadas el promedio de las respuestas máximas consecutivas a la administración de GABA (G); las barras punteadas representan las basales pretratadas con estradiol (E2) progesterona (P4) o estradiol y progesterona (E2/P4) respectivamente y las barras cuadrículadas grandes representan las respuestas máximas consecutivas a la administración de GABA con los tratamientos mencionados para la basal inmediata anterior, como se indica en la parte inferior de cada grupo. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. El número de casos por grupos se señala arriba de cada barra entre paréntesis. La preincubación con estradiol (100nM) no modifica la magnitud de los cambios en las  $[Ca^{2+}]_i$  generados por GABA. El tratamiento por 6 horas con progesterona (20nM) reduce significativamente la respuesta. Por el contrario, la co-incubación por con estradiol y progesterona incrementa la magnitud de la respuesta.

## Discusión

En el presente trabajo se estudió la modulación que los esteroides gonadales ejercen de manera directa sobre las acciones postsinápticas inducidas por GABA, en neuronas GnRHérgicas inmortalizadas. Para ello montamos y validamos una técnica de fluorometría. Utilizamos un espectrofluorómetro que posee dos monocromadores (uno de excitación y otro de emisión) y un fotomultiplicador, que permite amplificar la señal obtenida de los monocromadores en tiempo real. Con el objeto de validar esta técnica de registro de los cambios transitorios en la  $[Ca^{2+}]_i$  se utilizó ionomicina. Este compuesto es un ionóforo de calcio, el cual se inserta en la membrana celular permitiendo la entrada de calcio de manera no regulada. Como era de esperarse, la administración de dosis crecientes de ionomicina condujo a un incremento progresivo de la  $[Ca^{2+}]_i$  en las células GT<sub>1-7</sub> en suspensión. Sorprendentemente, la preincubación con estradiol (100nM) por 24 horas disminuyó la magnitud de la respuesta en dos de las dosis de ionomicina empleadas. El mecanismo responsable de este efecto es desconocido. Sin embargo, debido a que la magnitud de los cambios en las  $[Ca^{2+}]_i$  deberían reflejar el número de moléculas de ionomicina insertadas en la membrana, es probable que el efecto observado después de la preincubación con estradiol se deba a la disminución del número de moléculas de ionomicina insertadas en la membrana. El efecto reportado para los esteroides de modificar la fluidez y otros parámetros de las membranas celulares podría apuntar hacia un posible mecanismo de este efecto. Una alternativa adicional que no podemos descartar es que el estradiol modifique

la permeabilidad iónica a través de la activación de cascadas de segundos mensajeros, y de esta forma altere la conductancia de la ionomicina por medio de algunos de los metabolitos derivados de las cascadas de segundos mensajeros activadas por el estradiol. Otra alternativa se presenta por el hecho de que el estradiol activa canales de  $K^+$  vía proteínas G (Mermelstein *et al.*, 1996). La salida de  $K^+$  provocaría una hiperpolarización en las células GT<sub>1-7</sub>, cuyo resultado alteraría posiblemente la entrada de calcio extracelular. Además, se ha documentado que el estradiol también bloquea la actividad de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, promoviendo una hiperpolarización. Ambos efectos pudieran estar actuando en estas células alterando el metabolismo del calcio y por ende disminuyendo la magnitud de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por ionomicina. Es claro que cualquiera de estas posibilidades deben ser investigadas en mayor detalle.

Es conocido que el GABA aumenta la secreción de GnRH. Incluso en células GT<sub>1</sub>, se ha mostrado un incremento de la secreción de GnRH en respuesta a dosis crecientes de GABA (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). Debido a que la magnitud de la liberación de GnRH depende directamente de los cambios correlativos en las  $[Ca^{2+}]_i$ , la determinación de cambios en la concentración de calcio pueden ser utilizados para inferir modificaciones en los procesos de secreción. En concordancia con resultados previos, la aplicación de dosis crecientes de GABA en células GT<sub>1-7</sub> en suspensión promovió incrementos progresivos, si bien no con una clara relación dosis-efecto en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Incluso, hemos sido capaces recientemente

de observar claras respuestas en monocapas de células GT<sub>1-7</sub> (Betrán y Uribe-Querol, inéditos).

El objetivo fundamental del presente proyecto fue el de evaluar la posible modulación de los esteroides ováricos sobre respuestas de las células GT<sub>1-7</sub>, en particular elegimos las respuestas generadas por la aplicación de GABA. Para ello realizamos experimentos en los que preincubamos con estradiol, progesterona o la combinación de estas a células GT<sub>1-7</sub> antes de la aplicación de GABA y el registro de la respuesta de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En las dos series experimentales que realizamos en donde la incubación con estradiol por 24 horas precedió a la administración de GABA, no se observaron cambios en la magnitud de las respuestas en la  $[Ca^{2+}]_i$  evocada por diversas dosis de GABA. En contraste, la preincubación de células GT<sub>1-7</sub> con progesterona por 6 horas redujo significativamente la magnitud de los cambios en las  $[Ca^{2+}]_i$  asociadas a la aplicación de GABA. Por su parte con estradiol por 24 horas, de las cuales los últimas 6 horas correspondieron a una coincubación con estradiol y progesterona, revertió el efecto de la progesterona en la magnitud de los cambios en las  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a la administración de GABA.

Los mecanismos celulares y moleculares responsables de mediar los efectos moduladores postsinápticos de los esteroides ováricos sobre la respuesta de las células GnRHérgicas al GABA son aún desconocidos. El decremento de la respuesta al GABA observado después de la aplicación de progesterona podría ser el resultado de una hiperpolarización de la membrana de las células GT<sub>1-7</sub> consecutiva a la activación directa de corrientes salientes de canales de K<sup>+</sup>, y/o al

bloqueo de las corrientes entrantes de calcio sensibles a voltaje (Figura 16). Este efecto ha sido documentado para estradiol en neuronas hipocámpicas (Kelly y Wagner, 1999). Por otro lado, el incremento de la respuesta a GABA asociada a la interacción sinérgica de estradiol y progesterona pudiera ser explicado a través de mecanismos genómicos. En este escenario, el estradiol promueve la transcripción de receptores clásicos para progesterona, los que a su vez, modifican la expresión de otros genes tales como aquellos relacionados a la síntesis de canales de calcio y/o receptores a GABA<sub>A</sub> (Figura 17). El incremento en el número de receptores a GABA<sub>A</sub> facilitaría la salida de cloro y conduciendo a la membrana a un potencial depolarizado mismo que favorecería la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, y así un aumento en la cantidad de  $[Ca^{2+}]_i$  y en la liberación de GnRH (Figura 17)

El efecto anestésico de la progesterona y la fluidez de la membrana pueden ser también los responsables del decremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que observamos.

La manifestación adecuada de la fisiología reproductiva en los mamíferos depende de la interacción armónica y recíproca entre el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas. Dicha interacción es mediada por mensajeros químicos conocidos como hormonas, las que a través de mecanismos de retroalimentación modulan su síntesis y secreción. Así, es conocido que el estradiol y la progesterona regulan negativa o positivamente, dependiendo del estado funcional, los niveles séricos de las hormonas producidas, por un lado, en el hipotálamo, y por el otro, en la glándula hipófisis. No obstante que estas asas de regulación endócrina se conocen

desde hace mucho tiempo, los mecanismos celulares y moleculares que la subyacen han sido caracterizados sólo de manera parcial. Esto es particularmente cierto para el caso de la liberación de GnRH hipotalámica.

El estradiol y la progesterona regulan la liberación de GnRH a través de dos mecanismos, a saber, de manera indirecta y de manera directa. En el primer caso, está bien documentado que los esteroides ováricos modulan la liberación de dopamina,  $\beta$ -endorfinas, y GABA en las interneuronas aferentes a las neuronas GnRHérgicas.

En el segundo caso, los esteroides modulan el efecto postsináptico de varios neurotransmisores sobre las neuronas GnRHérgicas, a través de activar proteínas G y proteína cinasa A. Estos efectos se manifiestan por cambios metabólicos mediados por segundos mensajeros y por cambios en la permeabilidad iónica.

Figura 16. Modelo de la modulación por progesterona del efecto de GABA en células GT<sub>1-7</sub>. En este modelo se muestra el posible mecanismo de acción de la progesterona sobre canales de potasio alterando así el flujo de iones de potasio y por lo tanto promoviendo una hiperpolarización de la célula que conlleva a que la cantidad de calcio que entra a la célula al ser activada por GABA sea menor. Este mecanismo nos explica porque la progesterona promueve un decremento en la cantidad de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Figura 17. Modelo de la modulación por esteroides del efecto de GABA en células GT<sub>1-7</sub>. En este caso se muestra el efecto genómico del estradiol sobre la producción de receptores a progesterona. La progesterona estaría actuando de alguna manera sobre la respuesta de los receptores a GABA y/o los canales de calcio.

### **Conclusiones**

1. El estadiol modula la respuesta a ionomicina en células GT<sub>1-7</sub>.
2. El estradiol no modifica los efectos del GABA sobre las células GT<sub>1-7</sub>
3. La progesterona inhibe la respuesta de las células GT<sub>1-7</sub> al GABA
4. La coincubación de ambos esteroides revierte la respuesta de progesterona en las células GT<sub>1-7</sub> a GABA
5. Estos efectos apoyan la hipótesis de acciones directas esteroideas sobre las neuronas GnRHérgicas.

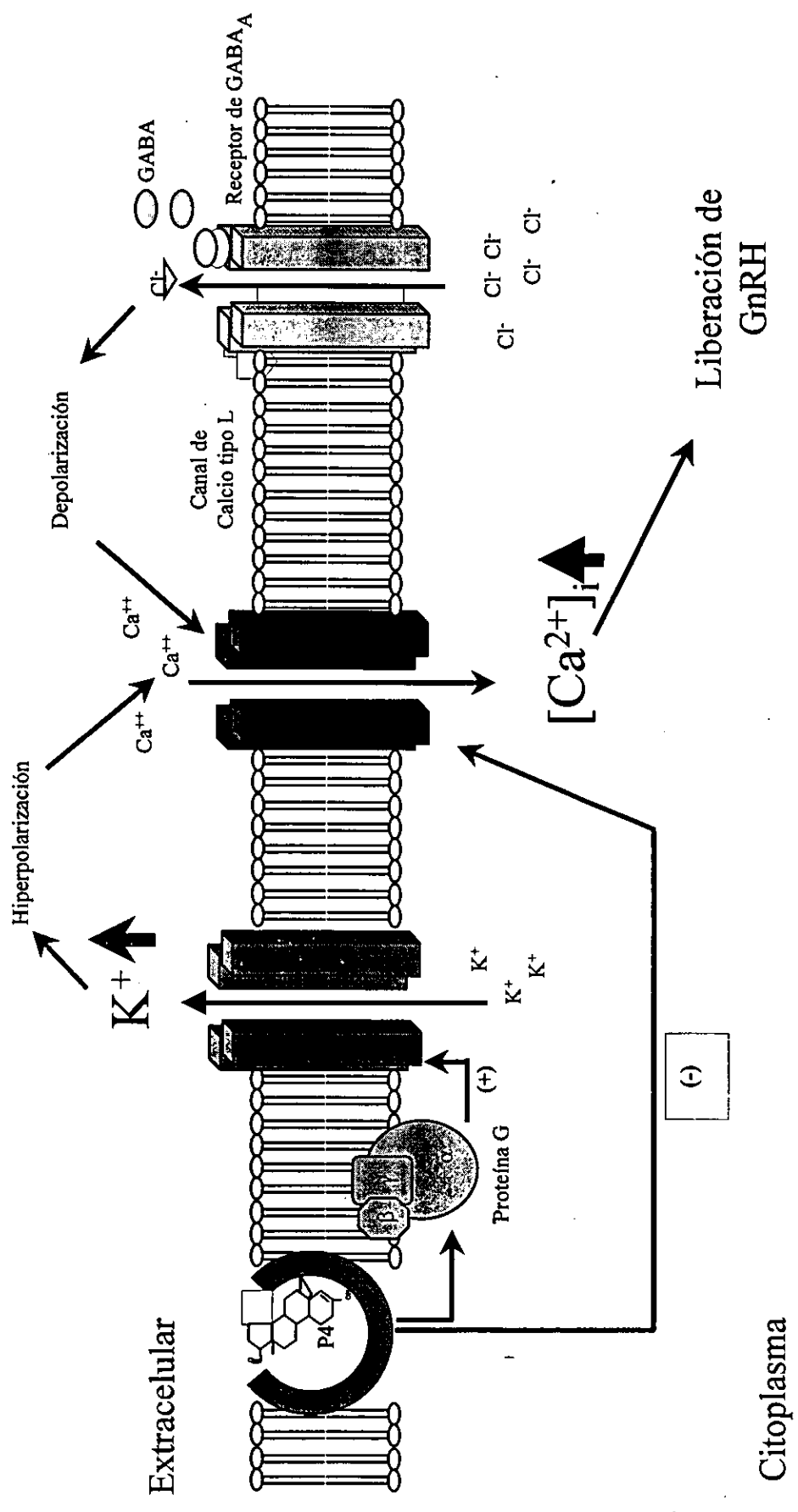


Figura 16



## BIBLIOGRAFÍA

- Akema T y Kimura F (1992) *Modulation of pulsatile LH secretion by baclofen, a selective GABA<sub>B</sub> receptor agonist, in ovariectomized rats*. Neuroendocrinology 56(2):141-147
- Alonso-Solis R, Abreu P, López-Coviella I, Hernández K, Fajardo N, Hernández-Díaz F, Díaz-Cruz A y Hernández A (1996) *Gonadal steroid modulation of neuroendocrine transduction: A transynaptic view*. Cell Mol Neuro 16(3):357-382
- Aronica SM y Katzenellenbogen BS (1993) *Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I*. Mol Endocrinol 7:743-752
- Belsham DD, Wetsel WC y Mellon PL (1996) *NMDA and nitric oxide act through the cGMP signal transduction pathway to repress hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression* EMBO J 15(3):538-547
- Bosma MM (1993) *Ion channel properties and episodic activity in isolated immortalized gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons*. J Membr Biol 136(1):85-96
- Bourguignon JP, Gérard A, Purnelle G, Czajkowski V, Yamanaka C, Lemaître M, Rigo JM, Moonen G y Franchimont P (1997) *Duality of glutamatergic and GABAergic control of pulsatile GnRH secretion by rat hypothalamic explants: I. Effects*

*of antisense oligodeoxynucleotides using explants including or excluding the preoptic area.* J Neuroendocrinol 9(3):183-191

- Clarke IJ y Cummins JT (1982) *The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes.* Endocrinology 111(5):1737-1739
- Chandran UR, Attardi B, Friedman R, Dong KW, Roberts JL y DeFranco DB (1994) *Glucocorticoid receptor-mediated repression of gonadotropin-releasing hormone promoter activity in GT<sub>1</sub> hypothalamic cell lines.* Endocrinology 134:1467-1474
- Chen W-P, Witkin JW y Silverman AJ (1989a). *Beta-endorphin and gonadotropin releasing hormone synaptic input to gonadotropin releasing hormone neurosecretory cells in the male rat.* J Comp Neurol 286:85-95
- Chen W-P, Witkin JW y Silverman AJ (1989b) *Sexual dimorphism in the synaptic input to gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons.* Endocrinology 126:695-702
- Cheng G, Trombley PQ y van den Pol PQ (1995) *GABA receptors precede glutamate receptors in hypothalamic development; differential regulation by astrocytes.* J Neurophysiol 74(4):1473-84
- Chester-Jones I, Ingleton PM y Phillips JG (1987) *Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology* Lenum Press New York
- Evans RM (1988) *The steroid and thyroid receptor superfamily.* Science 240:889-895.
- Feleder C, Jarry H, Leonhardt S, Wuttke W y Moguilevsky JA (1996) *The*

*GABAergic control of gonadotropin-releasing hormone secretion in male rats during sexual maturation involves effects on hypothalamic excitatory and inhibitory amino acid systems. Neuroendocrinology 64(4):305-12*

- Gobbetti A y Zerani M (1998) *Nitric oxide mediates gonadotropin-releasing hormone effects on frog pituitary. J Neuroendocrinol 10(6):407-416*
- Goldsmith PC, Thind KK y Perera AD (1992) *Glutamate-immunoreactivity terminals synapse with GnRH neurons in the monkey hypothalamus. Soc Neurosci Abstr 185-192.*
- Griffin JE y Ojeda SR (1992) *Textbook of endocrinology physiology Second Edition. Oxford University Press New York*
- Hales TG, Sanderson MJ y Charles AC (1994) *GABA has excitatory actions on GnRH-secreting immortalized hypothalamic (GT1-7) neurons. Neuroendocrinology 59(3):297-308*
- Ignar-Trowbridge DM, Teng CT, Ross KA, Parker MG, Korach KS y McLechlan JA (1993) *Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation at an estrogen-responsive element. Mol Endocrinol 7:992-998*
- Inoue Y, Shimamura K y Sperelakis N (1992) *Oxytocin actions on voltage-dependent ionic channels in pregnant rat uterine smooth muscle cells. Can J Physiol Pharmacol 70(12):1597-1603*
- Jennes L, Stumpf WE y Sheedy ME (1985) *Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. J Comp Neurol*

232(4):534-47

- Joëls M y de Kloet ER *Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones.* Neurosci 15(1):25-30 1992
- Jung N, Sun W, Lee H, Cho S, Shim C y Kim K (1998). *Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene regulation by N-methyl-D-aspartic acid in GT<sub>1-1</sub> neuronal cells: differential involvement of c-fos and c-jun protooncogenes.* Brain Res Mol Brain 61(1-2):162-9
- Jung H, Shannon EM, Fritschy JM y Ojeda S (1998) *Sevaral GABA<sub>A</sub> subunits are expressed in LHRH neurons of juvenile female rats.* Brain Research 780:218-229.
- Karaviti LP y Angelides KJ (1993) *Expression of progesterone and dopamine receptors on GnRH neurons.* Endocrine Soc., Abstract #955
- Katzenellenbogen BS (1996) *Estrogen receptors: Bioactivities and interactions with cell signaling pathways* Biol Reprod 54(2):287-93
- Kelly MJ y Wagner EJ (1999) *Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors.* TEM 10(9):369-374
- Kepa JK, Jacobsen BM, Boen EA, Prendergast P, Edwards DP, Takimoto G y Wierman ME (1996) *Direct binding of progesterone receptor to nonconsensus DNA sequences represses rat GnRH.* Molecular and Cellular Endocrinology 117:27-39
- Kerrigan JR, Yasin M, Haisenleder DJ, Dalkin AC y Marshall JC (1995) *Regulation of gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression in gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-deficient female rats: effects of GnRH,*

- galanin, GnRH-associated peptide, neuropeptide-Y, and thyrotropin-releasing hormone. Biol Reprod 53(1):1-7*
- King TS, Potter D, Kang IS, Norris C, Chen E, Schenken RS y Javors MA (1999) *Concentration-dependent effects of muscimol to enhance pulsatile GnRH release from GT<sub>1-7</sub> neurons in vitro. Brain Res 248(1):56-62*
  - Kiss J y Halasz B (1985) *Demonstration of serotonergic axons terminating of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry and high resolution autoradiography. Neuroscience 14:69-78*
  - Knobil E (1990) *The GnRH pulse generator. Am J Obstet Gynecol 163:5 Pt 2 1721-7*
  - Knobil E y Neill JD (1994) *The Physiology of reproduction. Volume 1 Second edition Raven Press. New York*
  - Knobil E y Neill JD (1994) *The Physiology of reproduction. Volume 2 Second edition Raven Press. New York*
  - Kohsaka A, Watanobe H, Kakizaki Y y Suda T (1999) *A comparative study of the effects of nitric oxide and carbon monoxide on the in vivo release of gonadotropin-releasing hormone and neuropeptide Y from rat hypothalamus during the estradiol-induced luteinizing hormone surge: estimation by push-pull perfusion. Neuroendocrinology 69(4): 245-253*
  - Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Merelli F, Dufour SM, Virmani MA, Catt KJ (1992) *Calcium signaling and episodic secretion of gonadotropin-releasing*

*hormone in hypothalamic neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 89(18):8462-8466*

- Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko, Nilsson S y Gustafsson J-A (1996) *Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci USA 93:5925-5930*
- Lamberts R, Vijayan E, Graf M, Mansky T y Wuttke W (1983) *Involvement of preoptic-anterior hypothalamic GABA neurons in the regulation of pituitary LH and prolactin release. Exp Brain Res 52(3):356-62*
- Leranth C, MacLuskey NJ, Shanabrough M y Naftolin F (1988). *Catecholaminergic innervation of luteinizing hormone-releasing hormone and glutamic acid decarboxylase immunopositive neurons in the rat medial preoptic area. Electron-microscopic double label and degeneration study. Neuroendocrinology 48:591-602*
- Leranth C, MacLuskey NJ, Sakamoto H, Shanabrough M y Naftolin F (1985a) *Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. Neuroendocrinology 40(6):536-9*
- Leranth C, Segura LM, Palkovits M, MacLuskey NJ, Shanabrough M, Naftolin F (1985b) *The LH-RH-containing neuronal network in the preoptic area of the rat: demonstration of LH-RH-containing nerve terminals in synaptic contact with LH-RH neurons. Brain Res 345(2):332-6*
- Levine JE y Duffy MT (1988) *Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats. Endocrinology 122(5):2211-21*

- Li C, Chen P, Smith MS (1999) *Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors.* Endocrinology 140(11):5382-90
- Mahachoklertwattana P, Black SM, Kaplan SL, Bristow JD y Grumbach MM (1994) *Nitric oxide synthesized by gonadotropin-releasing hormone neurons is a mediator of N-methyl-D-aspartate(NMDA)-induced GnRH secretion.* Endocrinology 135(4): 1709-12
- Mansky T, Mestres-Ventura P y Wuttke W (1982) *Involvement of GABA in the feedback action of estradiol on gonadotropin and prolactin release: hypothalamic GABA and catecholamine turnover rates.* Brain Res 231(2):353-364
- Marler P y Hamilton WJ (1966) *Mechanisms of animal behavior* De John Wiley & Sons. New York
- Martínez de la Escalera G, Choi ALH y Weiner IR (1992c) *Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone pulses: intrinsic properties of the GT<sub>1-1</sub> GnRH neuronal cell line.* Proc Natl Acad Sci USA 89:1852-1855
- Martínez de la Escalera G, Choi ALH y Weiner IR (1992b)  *$\beta$ 1-adrenergic regulation of the GT1 GnRH neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase.* Endocrinology 131:1397-1402
- Martínez de la Escalera G, Choi ALH y Weiner RI (1994b) *Biphasic gabaergic regulation of GnRH secretion in GT1 cell lines.* Neuroendocrinology 59:420-425.

- Martínez de la Escalera G, Gallo F, Choi AL, Weiner RI (1992a) *Dopaminergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via D1-receptors positively coupled to adenylate cyclase.* Endocrinology 131(6): 2965-71
- Masotto C y Negro-Vilar A (1987) *Activation of gamma-aminobutyric acid B-receptors abolishes naloxone-stimulated luteinizing hormone release.* Endocrinology 121(6):2251-5
- Masotto y Negro-Vilar (1988) *Gonadectomy influences the inhibitory effect of the endogenous opiate system on pulsatile gonadotropin secretion.* Endocrinology 123(2):747-52
- McEwen B (1996) *Gonadal and adrenal steroids regulate neurochemical and structural plasticity of the hippocampus via cellular mechanisms involving NMDA receptors.* Cell Mol Neurobiol 16:103-116.
- Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL y Weiner (1990) *Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis.* Neuron 5:1-10
- Merchenthaler I, Gorcs T, Setalo G, Pertrusz P y Flerko B (1984) *Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain.* Cell Tissue Res 237:15-29
- Merchenthaler I, Setalo G, Csontos C, Pertrusz P, Flerko B y Negro-Vilar A (1989) *Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of of*

*luteinizing hormone-releasing hormone- and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of rat. Endocrinology 125:2812-2821*

- Moguilevsky JA, Carbone S, Szwarcfarb B y Rondina D (1991) *Sexual maturation modifies the GABAergic control of gonadotrophin secretion in female rats. Brain Res 563(1-2):12-6*
- Moss RL, Gu Q y Wonk M (1997) *Estrogen: Nontranscriptional signaling pathway Recent Prok Horm Res 52:33-68*
- Mosselman S, Polman J y Dijkema R (1996) *ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett 3928(1):49-53*
- Muske LE (1993) *Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal Systems. Brain Behav Evol 42:215-230*
- Nikolarakis KE, Loeffler JP, Almeida OF y Herz A (1988) *Pre- and postsynaptic actions of GABA on the release of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Brain Res Bull 21(4):677-83*
- Noris G, Hol D, Clapp C y Martínez de la Escalera G (1995) *Histamine directly stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion from GT<sub>1-1</sub> cells via H1 receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis. Endocrinology Jul 136(7):2967-74*
- Ondo JG (1974) *Gamma-aminobutyric acid effects on pituitary gonadotropin secretion. Science 186(4165):738-9*
- Parker MG, Arbuckle N, Dauvois S, Danielian P y White R (1993) *Structure and function of the estrogen receptor. Ann N Y Acad Sci 684:119-26*

- Poletti A, Melcangi RC, Negri-cresi P, Maggi R y Martini L (1994) *Steroid binding and metabolism in the luteinizing hormone-releasing hormone-producing neuronal cell line GT<sub>1-1</sub>*. Endocrinology 135(6):2623-2628
- Prevot V, Croix D, Rialas CM, Poulain P, Fricchione GL, Stefano GB, Beauvillain JC (1999) *Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor*. Endocrinology 140(2):652-658
- Prevot V, Rialas CM, Croix D, Salzet M, Dupouy JP, Poulain P, Beauvillain JC, Stefano GB (1998) *Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation* Brain Res 790(1-2):236-244
- Schunlkin J (1993) *Hormonally induced changes in Mind and Brain* Academic Press London
- Segovia CT, Salgado ZO, Clapp C, Martínez de la Escalera G (1996) *The catecholaminergic stimulation of gonadotropin-releasing hormone release by GT<sub>1-1</sub> cells does not involve Phosphoinositide hydrolysis*. Life Sci 58(17):1453-9
- Shivers B, Harlan R, Morrel J y Pfaff DW (1983) *Absence of estradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons*. Nature 304:3445-347
- Silverman AJ y Krey LC (1978) *The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal network of guinea pig brain I. Intra- and extrahypothalamic projections*. Brain Res 157:233-246

- Silverman AJ, Jhamandas J y Renaud LP (1987) *Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to median eminence.* J Neurosci 7:2312-2319
- Silverman AJ, Kokoris GJ y Gibson MJ (1988) *Quantitative analysis of synaptic input to gonadotropin-releasing hormone neurons in normal mice and hpg mice with preoptic area grafts.* Brain Res 1988 443(1-2):367-72
- Slater, BJ y Halliday TR (1994) *Behavior and evolution* Cambridge University press Cambridge.
- Sortino MA, Aleppo G, Scapagnini U y Canonico PL (1994). *Involvement of nitric oxide in the regulation of gonadotropin-releasing hormone release from the GT<sub>1-1</sub> neuronal cell line.* Endocrinology 134(4):1782-7
- Spergel DJ, Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS y Catt KJ (1995) *L-type Ca<sup>2+</sup> channels mediate joint modulation by gamma-amino-butyric acid and glutamate of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and neuropeptide secretion in immortalized gonadotropin-releasing hormone neurons.* Neuroendocrinology 61(5):499-508
- Stojilkovic SS, Krsmanovic LZ, Spergel DJ, Tomic M y Catt KJ (1994) *Calcium signaling and episodic secretory responses of GnRH neurons.* Meth Neurosci 20:68-84
- Thind KK y Goldsmith PC (1988) *Infundibular gonadotropin releasing hormone neurons are inhibited by direct opioid and autoregulatory synapses in juvenile monkeys.* Neuroendocrinology 47:203-216

- Thind KK, Boggan JE y Goldsmith PC (1991) *Interactions between vasopressin- and gonadotropin-releasing-hormone-containing neuroendocrine neurons in the monkey supraoptic nucleus*. Neuroendocrinology 53:287-297 .
- Tsai M y O'Malley BW (1994) *Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members*. Annu Rev Biochem 63:451-486
- Turgeon JL (1996) *Gonadotropin-releasing hormone neuron cell biology* TEM 7(2):55-56
- Weigel NL (1996) *Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation*. Biochem J 319(3):657-67
- Weiner RI, Wetsel W, Goldsmith P, Martinez de la Escalera G, Windle J, Padula C, Choi A, Negro-Vilar A y Mellon P (1992) *Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines*. Front Neuroendocrinol 13(2): 95-119
- Wierman ME, Bruder JM y Kepa JK (1995) *Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in hypothalamic neuronal cells*. Cell Mole Neuro 15(1):79-88
- Witkin JW (1992) *Increased synaptic input to gonadotropin releasing hormone neurons in aged virgin male SD rats*. Neurobiol Aging 13:681-686

## Índice de Figuras

|                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Eje Hipotálamo-hipófisis-gónadas                                                                                                                     | 13 |
| Figura 2. Cambios en los niveles hormonales durante el ciclo menstrual                                                                                         | 16 |
| Figura 3. Biosíntesis de esteroides ováricos                                                                                                                   | 21 |
| Figura 4. Representación esquemática de los elementos intracelulares de respuesta a esteroides                                                                 | 23 |
| Figura 5. Estructura del gene y del péptido de la GnRH                                                                                                         | 27 |
| Figura 6. Estructuras del INDO-1-AM y del FURA-2-AM                                                                                                            | 43 |
| Tabla 1. Especificaciones de los métodos para medir la $[Ca^{+2}]_i$ con células en suspensión y con células en monocapa, con INDO-1 y FURA-2, respectivamente | 44 |
| Figura 7. Espectros de emisión del INDO-1                                                                                                                      | 46 |
| Figura 8. Espectro de excitación del FURA-2                                                                                                                    | 48 |
| Figura 9. Registro de la $[Ca^{+2}]_i$ en suspensiones de células GT <sub>1-7</sub> , utilizando INDO-1, en respuesta a Ionomicina                             | 49 |
| Figura 10. Registro de la $[Ca^{+2}]_i$ en suspensiones de células GT <sub>1-7</sub> , utilizando INDO-1 en respuesta a GABA                                   | 50 |
| Figura 11. Relación dosis-respuesta del efecto evocado por ionomicina.                                                                                         | 53 |
| Figura 12. Relación dosis-respuesta del efecto evocado por GABA                                                                                                | 55 |
| Figura 13. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la respuesta de la $[Ca^{+2}]_i$ inducido por ionomicina                                                     | 58 |
| Figura 14. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la respuesta de la $[Ca^{+2}]_i$ inducido por GABA                                                           | 59 |
| Figura 15. Efecto del 17 $\beta$ -estradiol, progesterona o ambos sobre la $[Ca^{+2}]_i$ modulada por GABA                                                     | 62 |
| Figura 16. Modelo de la modulación por progesterona del efecto de GABA en                                                                                      | 69 |

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| células GT <sub>1-7</sub> .                                                                         |    |
| Figura 16. Modelo de la modulación por esteroides del efecto de GABA en células GT <sub>1-7</sub> . | 70 |