

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



*INFLUENCIA DEL ESTRADIOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE
RECEPTORES β 1-ADRENÉRGICOS Y D1-DOPAMINÉRGICOS EN
NEURONAS GnRHÉRGICAS GT1-7.*

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
PRESENTA:**

Q.B.P. JESSICA SARAIDH JACOBI ELIZONDO

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA**

JURIQUILLA, QRO. A OCTUBRE DEL 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, por su excelente orientación en el desarrollo de la presente tesis y en mi formación académica y científica.

Muy especialmente a Gabriel R. Nava Pinto, quien me capacitó para la realización de todas las técnicas utilizadas en el presente trabajo, además de su indispensable colaboración con el montaje del método de cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real.

Al Dr. Raúl Paredes Guerrero por su asesoría en el análisis estadístico y redacción del presente escrito.

A los revisores del presente escrito por sus valiosas contribuciones, los Drs. Alfredo Varela Echavarría, Enrique Pedernera Astegiano, Marco Antonio Sánchez Ramos, y la Dra. Carmen Aceves Velazco.

A Cecilia Martín González por su muy grata compañía y apoyo en el aprendizaje de esta línea de investigación, además de su colaboración con el desarrollo de los cultivos celulares.

Al excelente equipo de trabajo del laboratorio en donde realice el presente trabajo, incluyendo investigadores asociados, técnicos académicos, auxiliares laboratoristas, y compañeros estudiantes.

A todo el personal del departamento de posgrado del Instituto de Neurobiología, por su muy eficiente trabajo administrativo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, como también a la Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM por el apoyo económico otorgado durante el período de la maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de realizar este posgrado, y muy especialmente al Instituto de Neurobiología por la oportunidad de conocer la auténtica investigación científica.

Finalmente, a toda mi familia por su indispensable apoyo para la realización de este posgrado, sin lo cual no hubiera sido posible.

CONTENIDO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| 1.INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 2.ANTECEDENTES..... | 5 |
| 2.1 HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH)..... | 5 |
| 2.2 NEURONAS GnRHÉRGICAS INMORTALIZADAS..... | 6 |
| 2.3 REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA GnRH POR ESTRÓGENOS..... | 7 |
| 2.4 REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA GnRH POR CATECOLAMINAS..... | 12 |
| 2.5 INTERACCIÓN DE ESTRÓGENOS, NOREPINEFRINA Y DOPAMINA SOBRE LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA GnRH..... | 15 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 18 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 18 |
| 5. OBJETIVO..... | 18 |
| 6. MATERIAL Y METODO..... | 19 |
| 6.1 CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO..... | 19 |
| 6.2 EXTRACCIÓN DE RNA..... | 19 |
| 6.3 RETROTRANSCRIPCIÓN..... | 20 |
| 6.4 PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL..... | 20 |
| 6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 24 |
| 7. RESULTADOS..... | 25 |
| 7.1 ESTANDARIZACIÓN DE qPCR EN TIEMPO REAL..... | 25 |
| 7.2 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA..... | 28 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 33 |
| 9. CONCLUSIÓN..... | 40 |
| 10. REFERENCIAS..... | 41 |
| 11. ANEXOS..... | 50 |
| 11.1 ABREVIATURAS..... | 51 |

RESUMEN

La orquestación de la función reproductiva se lleva a cabo por señales neurales y hormonales que inciden sobre las neuronas neurosecretoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés). Entre los mecanismos que controlan la secreción de las gonadotropinas destacan las asas de retroalimentación positiva y negativa del estradiol. La aparente ausencia de receptores a estrógenos en las neuronas GnRHérgicas llevó a suponer que estas asas de retroalimentación actuaban de manera indirecta, vía interneuronas aferentes a las neuronas GnRHérgicas de tipo noradrenérgico, gabaérgico y opioidérgico, las cuales expresan abundantes receptores a esteroides. Sin embargo, mediante métodos analíticos de alta sensibilidad se ha encontrado la expresión de receptores a estrógenos en neuronas GnRHérgicas *in situ* y en líneas inmortalizadas como las GT1. Por otra parte, múltiples neurotransmisores están involucrados en la compleja señalización de la regulación del eje reproductivo, incluyendo las catecolaminas. Numerosos estudios han demostrado que la norepinefrina (NE) y la dopamina (DA) participan en el control de la secreción de gonadotropinas. Además, se ha propuesto que existe una regulación estrogénica de la comunicación sináptica mediada por receptores a NE y DA que modula la fisiología del eje reproductivo. Para substanciar esta hipótesis en neuronas GnRHérgicas GT1, nos propusimos determinar la influencia del estradiol sobre la expresión génica de los receptores β 1-adrenérgicos y D1-dopaminérgicos. En este estudio hemos tratado cultivos de células GT1-7 con 17β -estradiol, a dosis de 0.1, 1.0 ó 10 nM durante un período de 6, 24 ó 48 h. Al analizar mediante PCR cuantitativo en tiempo real el cDNA correspondiente a estas células, encontramos incrementos significativos en la expresión de los receptores β 1-adrenérgicos y D1-dopaminérgicos. Demostrando así, que el estradiol participa en el circuito de retroalimentación del eje reproductivo de forma directa sobre las neuronas secretoras de la GnRH. Este efecto implicaría un aumento en el flujo de información por las aferencias dopaminérgicas y adrenérgicas, mediante el incremento en la expresión de los receptores que responden a estas señales en las neuronas GnRHérgicas; lo cual podría ser un componente del mecanismo de retroalimentación positiva por el cual los estrógenos regulan la liberación de la GnRH.

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción es una función esencial de los organismos, ya que de ésta depende la continuidad de las especies. La función reproductiva en los mamíferos es regulada por señales neurales y hormonales en las que intervienen el hipotálamo, la hipófisis anterior y las gónadas. Los estímulos que afectan la secreción de las hormonas hipofisarias pueden originarse dentro o fuera del organismo. Estos estímulos son percibidos y procesados por el cerebro, el cual envía una señal a la hipófisis para aumentar o disminuir la tasa de secreción de una hormona determinada. Las células que producen las hormonas de la hipófisis anterior no están inervadas por fibras secretomotoras, por esta razón no están bajo regulación nerviosa sináptica. Su actividad secretora está regulada por las hormonas liberadoras o hipofisiotrópicas producidas por el hipotálamo. A esta importante conexión funcional entre el cerebro y la hipófisis, en la que el hipotálamo tiene una función clave, se le denomina eje hipotálamo-hipofisiario (ver Rhoades y Tanner, 1997). Al circuito que regula la función reproductiva en el cual además de estas dos estructuras participan también las gónadas, se le conoce como eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal (HHG).

El presente trabajo se enfoca al estudio de los mecanismos de acción de las hormonas que regulan la ovulación. Este proceso se define como la salida de un ovocito del ovario en condiciones de ser fecundado. Es un fenómeno que ocurre durante la etapa reproductiva del individuo y está regulado por la interacción de múltiples factores neuroendocrinos. Estos eventos neuroendócrinos modulan el crecimiento y la diferenciación de los folículos ováricos. Entre las hormonas que intervienen se incluyen a las gonadotropinas, es decir la hormona estimulante del folículo (FSH, por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés). También participan la prolactina y las hormonas secretadas por el ovario, en particular los estrógenos. Además, las hormonas de las suprarrenales y las hormonas reguladoras del metabolismo, como las hormonas secretadas por la tiroides y la hormona del crecimiento. Por su parte, participan neurotransmisores clásicos y peptidérgicos que llegan al ovario por los nervios o que son sintetizados en dicho órgano. Las gonadotropinas FSH y LH, están compuestas por dos subunidades glucoproteicas estructuralmente diferentes denominadas α y β , que se mantienen unidas por enlaces no covalentes. Son sintetizadas en la adenohipófisis por células especializadas, denominadas gonadotropos, que son capaces de producir una o ambas hormonas (ver Domínguez, 1993). En los individuos del sexo femenino, la FSH se transporta por el torrente sanguíneo desde la adenohipófisis hasta los ovarios, en donde estimula el

desarrollo del óvulo cada ciclo estral o menstrual. La FSH también actúa sobre las células granulosas de los ovarios para estimular la secreción de estrógenos. En los machos, la FSH actúa en los testículos estimulando a las células de Sertoli de los túbulos seminíferos para la producción de espermatozoides. Por su parte, la LH en las hembras, actúa junto con la FSH, estimulando la liberación de uno o más ovocitos, lo que constituye el proceso de ovulación. La LH también estimula la formación del cuerpo lúteo en el ovario, el cual secreta progesterona. Los estrógenos y la progesterona preparan al útero para la implantación de un huevo fertilizado y preparan a las glándulas mamarias para la secreción de leche. En el macho, la LH estimula a las células de Leydig, las cuales se localizan en el intersticio del testículo y producen los esteroides sexuales.

La liberación de la LH y la FSH está regulada por una hormona producida por el hipotálamo que recibe el nombre de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La liberación de la GnRH ocurre en forma de pulsos o picos con intervalos de entre 30 minutos y una hora, según la especie. Esta pulsatilidad es crucial para la manutención de diferentes aspectos de la función secretora de las gonadotropinas, incluyendo la regulación de la expresión de los receptores a la GnRH en la hipófisis (ver Haisenleder, et al., 1994). Los pulsos de la GnRH están modulados por un número importante de neuromediadores, que incluyen neurotransmisores clásicos, neuropéptidos, y esteroides ováricos. Siendo así, la secreción de la GnRH el punto final de integración de numerosos tipos de señales complejas del sistema nervioso central que regulan la fertilidad. Entre estas señales se encuentra el fotoperíodo, el ambiente esteroideo, el estatus nutricional y el estrés (ver Moenter, et al., 2003). Los mecanismos de retroalimentación que controlan la secreción de las gonadotropinas son más complejos de lo que inicialmente se había pensado. Entre estos se han postulado diversos procesos en los que el estradiol juega un papel fundamental (Herbison, 1998). Por otra parte, entre los neurotransmisores que están involucrados en la compleja señalización de la regulación del eje reproductivo, se incluyen a las catecolaminas. Numerosos estudios han demostrado que la norepinefrina (NE) y la dopamina (DA) participan en el control de la secreción de gonadotropinas (ver Kordon, et al., 1994). Además, se ha propuesto que existe una regulación de ésta comunicación sináptica mediada por receptores a NE y DA que modula la fisiología del eje reproductivo por efecto de esteroides ováricos (Etgen, et al., 2001).

El estudio de este sistema ha avanzado considerablemente mediante el desarrollo de líneas celulares inmortalizadas, como es el caso de las células GT1, las cuales presentan muchas de las características fisiológicas de las neuronas GnRHérgicas *in vivo* (ver Martínez de la Escalera y Clapp,

2001). En el presente estudio se propone determinar la influencia del estradiol sobre la expresión génica en neuronas productoras de GnRH de la línea celular GT1-7, particularmente sobre la expresión de receptores β 1-adrenérgicos y D1-dopaminérgicos, para estudiar uno de los mecanismos a nivel molecular mediante el cual se efectúa la regulación de la liberación de esta hormona implicada en la reproducción.

2. ANTECEDENTES

2.1 HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH)

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido lineal, pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, derivado de la transcripción de una molécula precursora, la pre-pro-GnRH. El precursor consta de 92 aminoácidos; 23 iniciales que actúan como secuencia de señal y una secuencia de Gly-Lis-Arg indispensable para el procesamiento de la molécula de la GnRH. La acción fundamental de esta hormona consiste en estimular la secreción y síntesis de la FSH y la LH, y parece participar también en la elaboración de patrones de conducta sexual (Mortimer et al., 1975; Moss et al., 1975; Pfaff, 1973).

La secreción de LH y FSH es estimulada a través del sistema del segundo mensajero AMPc cuando la GnRH se une a receptores metabotrópicos en la superficie de las células gonadotrópicas de la adenohipófisis. La respuesta hipofisiaria a la GnRH depende del número de estos receptores, el cual aumenta después del nacimiento y sufre variaciones cíclicas durante el ciclo reproductor (estro); aumenta tras la castración y disminuye durante el embarazo, lactancia y en el envejecimiento (ver Conn, 1994).

Las células productoras de la GnRH se originan en el área olfatoria, durante la embriogénesis migran hacia su principal localización en el núcleo arqueado del hipotálamo. Las neuronas GnRHérgicas no están agrupadas en núcleos separados sino formando redes laxas diseminadas en el hipotálamo, especialmente en el núcleo paraventricular posterior, el hipotálamo medio basal y el área preóptica; la mayoría están localizadas en el núcleo arqueado. Sus axones se proyectan hacia muchas áreas en el cerebro, pero especialmente hacia la eminencia media, a través del tracto túbero-infundibular. Esta hormona puede ser secretada desde los botones terminales a los vasos portales que conducen la hormona hasta sus células blanco en la adenohipófisis. La GnRH también se ha localizado en áreas centrales extrahipotalámicas, y en órganos periféricos que incluyen los ovarios, testículos, placenta y glándula mamaria (ver Strand, 1999).

El control que ejerce esta hormona sobre el ciclo reproductor depende de su secreción sostenida y pulsátil en virtud de una serie de interrelaciones con neurohormonas, esteroides sexuales, gonadotropinas hipofisiarias y neurotransmisores del sistema nervioso central (SNC). Estas interrelaciones se establecen en función de mecanismos de retroalimentación, tanto positivos como negativos de los cuales se han descrito tres tipos: retroalimentación larga entre la GnRH y esteroides

gonadales, retroalimentación corta entre la GnRH y gonadotropinas, y retroalimentación ultracorta entre la GnRH y su propia secreción modulada a través de neuromoduladores, que entre otros incluyen dopamina, norepinefrina, serotonina, melatonina y prostaglandinas.

A pesar de la enorme importancia de este sistema neuronal que comanda el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal, muchas preguntas fundamentales acerca de su funcionamiento permanecen sin respuesta. Esto es debido a que su estudio se dificulta por la distribución difusa de éstas neuronas productoras de la GnRH en el hipotálamo y área preóptica, así como por su escaso número, el cual no rebasa las dos mil células (Silverman, et al., 1987). Sin embargo, mediante el desarrollo de tumorigénesis genéticamente dirigida en ratones transgénicos, que tuvieron el objeto de establecer líneas inmortales neuronales altamente diferenciadas con utilidad experimental, se han obtenido líneas inmortales secretoras de la GnRH (Mellon, et al, 1990).

2.2 NEURONAS GnRHÉRGICAS INMORTALIZADAS

Entre las líneas celulares de neuronas GnRHérgicas immortalizadas que se han desarrollado se encuentra la GT1 (Weiner, et al., 1992). Esta línea celular fue obtenida provocando una tumorigénesis genéticamente dirigida con un gen híbrido consistente en la región reguladora del gen de la GnRH, y la región codificadora del oncogen antígeno T del virus SV40. Este gen híbrido se inyectó en el pronúcleo de cigotos fecundados de ratón en su fase de una sola célula, y éstos se transfirieron a oviductos de ratonas pseudoembarazadas. La integración de este transgen al genoma del embrión ocurre al azar, y una vez que forma parte de la línea germinal es segregado en forma hereditaria en las camadas de los animales fundadores. Una vez obtenidos los ratones transgénicos, se encontró en uno de estos un tumor en el área preóptica hipotalámica, del cual después de ser disectado y al transcurrir varios meses de cultivo, se obtuvo una población celular homogénea que presentaba un fenotipo neuronal distintivo. Tres líneas clonales derivadas de este cultivo han sido obtenidas por dilución limitante, a las que se les designó GT1-1, GT1-3 y GT1-7. Estas células además de expresar marcadores neuronales, proteínas específicas de membranas sinápticas y de presentar características ultraestructurales distintivas de neuronas neurosecretoras, procesan a la GnRH a partir de su precursor en forma indistinguible de lo que ocurre *in vivo*. El péptido se almacena en gránulos neurosecretores, y se libera como consecuencia de la despolarización (Mellon, et al, 1990).

Además, la secreción espontánea de la GnRH en cultivos de células GT1 en perfusión, ocurre en forma pulsátil, con una frecuencia muy similar a la observada *in vivo* en ratas y ratones castrados (Martínez de la Escalera et al., 1992a). Por lo tanto, la capacidad para generar y sincronizar pulsos de secreción de la GnRH parece ser una propiedad intrínseca de las neuronas secretoras de GnRH, en la que interviene un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Asimismo, esta secreción espontánea es susceptible de modulación tanto en amplitud como en frecuencia por una serie de neuromediadores, entre los que se encuentran neurotransmisores clásicos como la noradrenalina (Martínez de la Escalera et al., 1992b), la dopamina (Martínez de la Escalera, et al., 1992c) y el GABA (Martínez de la Escalera et al., 1994), además de péptidos como la vasopresina y la endotelina (Krsmanovic, et al., 1991). Estos efectos son mediados por receptores bien caracterizados, acoplados a cascadas de señales transmembranales claramente identificadas ((Martínez de la Escalera y Clapp, 2001).

2.3 REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA GnRH POR ESTRÓGENOS

Todos los procesos que intervienen en la síntesis y liberación de la GnRH (tasa de transcripción, estabilidad del RNA mensajero, el procesamiento post-traducciona, etc.) son activamente regulados en las neuronas GnRHérgicas, a través de una serie de sistemas de control. Uno de los mas importantes es representado por los mecanismos de retroalimentación por esteroides gonadales. El concepto de efectos esteroideos, los cuales podrían modular la liberación de la GnRH fue postulado inicialmente en 1930. Sin embargo, esto todavía es un punto controversial en la neuroendocrinología de la reproducción, en cuanto a cómo y en dónde actúan las hormonas esteroides para ejercer sus efectos de retroalimentación negativa o positiva (ver Melcangi et al., 2002).

Se conoce que la respuesta a estrógenos del sistema secretor de la GnRH es diferente en machos que en hembras. Esto está determinado inicialmente durante el desarrollo, cuando en el macho ocurre el primer impacto de estrógenos sobre las neuronas GnRHérgicas. En esta etapa, el estradiol y la estrona resultantes de la aromatización de andrógenos producidos por el testículo fetal, actúan sobre la red GnRHérgica para masculinizarla (Doughty, et al., 1975a; Doughty, et al., 1975b; Vreeburg, et al., 1977). De esta manera, la respuesta del sistema secretor de la GnRH a estrógenos se define para la vida postnatal (ver Herbison, 1998).

En el caso de hembras adultas, los estrógenos ejercen una influencia estimuladora sobre la secreción de la GnRH actuando a nivel de la eminencia media, cuando se inicia el pico preovulatorio

de LH (Caratay et al., 1989; Evans et al., 1995). Para que se tenga lugar el pico preovulatorio de la GnRH se requiere una preexposición a estrógenos de la red GnRHérgica durante varias horas. Este prolongado periodo de exposición a estrógenos, inicia una cascada de eventos neurales que pueden impactar diferencialmente sobre la biosíntesis y secreción de la GnRH (ver Herbison, 1998). En cuanto a los efectos inhibitorios de las hormonas esteroides, se observó que en animales de ambos sexos, el remover las hormonas sexuales mediante gonadectomía causó un incremento en la secreción de la GnRH. Por lo que se determinó que tanto estrógenos como andrógenos actúan en el sistema nervioso central inhibiendo la liberación de este decapeptido (ver Kalra y Kalra, 1989). Hay evidencia que indica que este efecto inhibitorio ocurre sobre la secreción de la GnRH y en particular sobre la amplitud de los pulsos (Richardson et al., 1992; Chongthammakun and Terasawa, 1993; Evans et al., 1995). En comparación con la influencia estimuladora, la influencia inhibitoria de los estrógenos sobre la secreción de la GnRH ocurre rápidamente (1-2 horas) y se ha correlacionado con una inhibición de la actividad eléctrica de las neuronas GnRHérgicas (Caraty et al., 1989). Sin embargo, existe controversia en cuanto a los mecanismos de acción que ejercen tanto el efecto de retroalimentación positiva como negativa sobre la liberación de la GnRH. Se han realizado numerosas investigaciones para determinar el efecto de los estrógenos sobre la expresión génica de la GnRH, obteniéndose resultados controversiales. Ya que varios laboratorios reportaron incrementos, decrementos y ausencia de efectos sobre los niveles de RNA mensajero de la GnRH como resultado de diversos tratamientos estrogénicos. Al analizar de manera detallada esta literatura se identificaron varias diferencias metodológicas en las técnicas de hibridación, intervalos de gonadectomía, dosis y tipos de esteroides aplicados, etc., lo cual podría explicar las discrepancias (ver Melcangi et al., 2002). También se han analizado las posibles fluctuaciones de la expresión del gen de la GnRH durante el ciclo estral de ratas hembras intactas, obteniéndose resultados conflictivos. Se reportó que el RNA mensajero correspondiente a la GnRH no cambiaba durante el ciclo estral de la rata (Malik et al., 1991; Marks et al., 1994). Por el contrario, otros laboratorios han reportado un incremento en la expresión del gen de la GnRH a diferentes tiempos durante el día del proestro (ver Gore y Roberts, 1997).

Aunque la participación de estrógenos circulantes en el control por retroalimentación de este sistema está fuera de duda, era clásicamente aceptado que las neuronas GnRHérgicas no expresaban receptores a estas hormonas. Esta suposición surgió a partir de investigaciones basadas en técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, en los cuales se pretendió detectar el receptor a estrógenos.

Estos estudios dieron resultados que indicaron la ausencia de este tipo de receptores en las células GnRHérgicas o que estos se presentaban en cantidades muy limitadas (Shivers et al, 1983; Fox, et al., 1990; Herbison y Theodosis, 1992; Huang y Harlan, 1993; Lehman y Karsch, 1993). Debido a esto, se considero que los efectos estrogénicos directos mediante el mecanismo de acción genómica clásico (ver figura 1) no ocurre y se sugirió que la regulación de la liberación de la GnRH por estrógenos sería mediada por mecanismos de acción directos a través de la membrana (ver figura 2) (Herbison, 1998), y/o por mecanismos de acción indirectos. Estos últimos incluyen efectos estrogénicos sobre interacciones glía-neuronas GnRHérgicas (Rage, et al., 1997; Cavarretta, et al., 1999; Buchanan, et al., 2000) e interneuronas aferentes de naturaleza noradrenérgica, gabaérgica y opioidérgica, (Witkin, et al., 1991; Legan y Callahan, 1999; Lee, et al., 2000; Pau, et al., 2000; Zsarnovszky, et al., 2001; Rawson, et al., 2001; Anderson et al., 2001; Mitchell, et al., 2003). Siendo así, estos mecanismos indirectos podrían presentarse en diversas combinaciones, dando como resultado efectos de retroalimentación tanto negativo como positivo (Herbison y Pape, 2001).

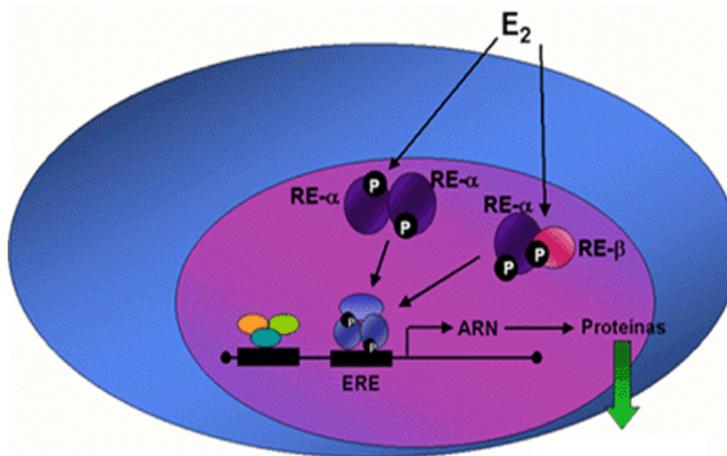


Figura 1. Mecanismo de acción genómica de las hormonas esteroides. Consiste en la entrada del esteroide a la célula blanco por difusión pasiva a través de la membrana plasmática, en donde se une a un receptor específico. Los complejos receptor-esteroide forman dímeros que se activan, proceso que incluye cambios conformacionales que le permiten unirse a sitios selectivos en la cromatina, en donde interactúa con secuencias específicas del DNA, denominadas elementos de respuesta a esteroides (ERE). De esta forma, el complejo receptor esteroide actúa como factor transcripcional modulando la expresión génica, responsable en última instancia del efecto hormonal. La mayoría de los efectos conocidos de los estrógenos son mediados por este mecanismo; a través de dos subtipos de receptores a estrógenos descritos hasta el momento; el receptor a estrógenos α (RE α) y el receptor a estrógenos β (RE β) (Falkenstein, et al., 2000).

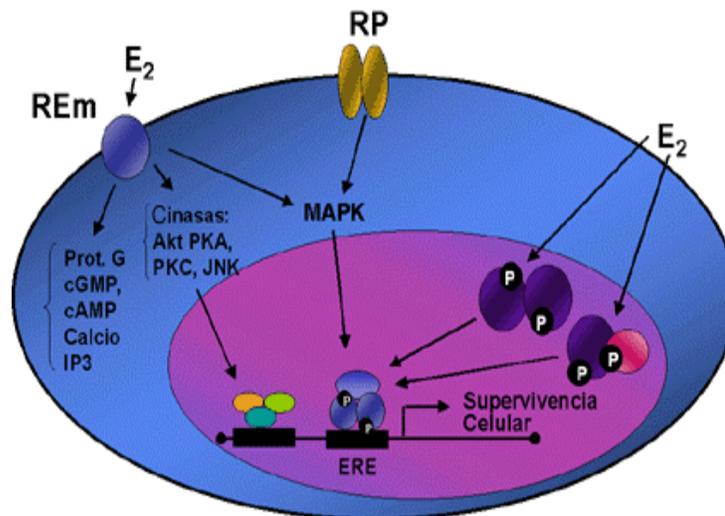


Figura 2. Mecanismos de acción no genómicos de las hormonas esteroides. En contraste con los mecanismos de acción genómica, los efectos esteroideos no genómicos son caracterizados principalmente por su insensibilidad a inhibidores de la transcripción y de la síntesis de proteínas, además de la evidencia experimental más obvia; su acción rápida que va de segundos a minutos lo cual no es compatible con cambios en la síntesis de RNA mensajero y proteínas. Este mecanismo consiste en la interacción de la hormona esteroide con receptores específicos de la membrana plasmática de la célula blanco, seguido por la activación de diversas vías de transducción de señales. Entre los efectos mediados por el receptor de membrana están la activación de canales de Ca⁺, proteínas G, interacción con receptores de péptidos (RP), activación de cinasas, etc. (ver Falkenstein, et al., 2000).

Sin embargo, posteriormente con el descubrimiento de un segundo receptor a estrógenos denominado receptor a estrógenos β (RE β) (Kuiper, et al., 1996) la biología de los estrógenos en general se vio forzada a ser reevaluada. Al receptor a estrógenos primeramente identificado se denominó receptor a estrógenos α (RE α). Entre otros aspectos se consideró la posibilidad de que el RE β se encontrara en las neuronas GnRHérgicas, por lo que fue analizado y posteriormente demostrado la expresión de receptores funcionales a estrógenos del tipo RE β en estas células (Skynner, et al, 1999; Herbison, et al, 2001; Hrabovszky et al., 2001). Además, al estudiar líneas celulares inmortalizadas de neuronas GnRHérgicas como las células GT1, se encontró que estas expresan los transcritos correspondientes a ambos receptores, el RE β y RE α , y que presentan estas proteínas funcionales (Poletti, et al., 1994; Radovick, et al., 1994; Shen, et al., 1998; Roy et al., 1999; Kallo, et al, 2001). Esto sugirió que los esteroides gonadales pueden influir directamente sobre células GnRHérgicas. Los efectos directos de los estrógenos sobre neuronas GnRHérgicas actualmente reportados, incluyen; biosíntesis, secreción y degradación de la GnRH, biosíntesis de galanina, modificación de la actividad eléctrica, y cambios ultraestructurales de estas neuronas (Herbison, 1998). Obviamente no se excluye la posibilidad de que existan mecanismos indirectos de regulación de la liberación de la GnRH por esteroides gonadales, lo cual actualmente continua siendo investigado (Mitchell, et al., 2003).

En base al modelo clásico de acción de hormonas esteroides, que implica la unión de esteroides a receptores intracelulares, seguido por la modulación de procesos transcripcionales después de la translocación del complejo receptor-esteroide al núcleo; los efectos directos de los estrógenos sobre células GnRHérgicas podrían implicar una regulación de la expresión de genes. Se ha demostrado que al tratar células GT1-7, con 17 β -estradiol (1nM), disminuyen los niveles basales del RNA mensajero correspondiente a la GnRH aproximadamente en un 55 % en el transcurso de 48 horas (Roy, et al, 1999). También en estudios con neuronas GnRHérgicas de monos *Cynomolgus*, se ha demostrado que hay un decremento en la expresión de la GnRH por tratamientos estrogénicos (Krajewski, et al., 2003). Incluso, se ha encontrado que la región promotora del gen humano que codifica para la GnRH, contiene varios elementos responsivos a hormonas esteroides (Radovick et al., 1991). Entre los genes modulados por estrógenos podrían estar los relacionados con la modulación de la liberación de la GnRH. Existen diversos trabajos que muestran efectos genómicos en células GnRHérgicas en respuesta a tratamientos estrogénicos, apoyando así esta hipótesis. Por ejemplo, se ha observado que

dosis fisiológicas de 17β -estradiol duplican la expresión del gen que codifica para el péptido galanina en células GT1 (Shen, et al, 1998). La galanina es un péptido implicado en la regulación del eje reproductivo, que entre otras células, se expresa en neuronas GnRHérgicas. A nivel del hipotálamo estimula la liberación de la GnRH y a nivel de la hipófisis actúa regulando la liberación de la LH, siendo estas funciones estrógeno dependientes (Lopez, et al., 1991; ver Splett, et al., 2003). También se ha encontrado que en células GT1, un tratamiento de 17β -estradiol (10 nM) por tres días incrementa la muerte neuronal inducida por glutamato; otro importante mediador del eje reproductivo. Esto sugiere un incremento en la expresión de receptores N-metil-D-aspartato, por efecto estrogénico (Yang, 2003). A partir del hallazgo de este tipo de efectos estrogénicos directos sobre neuronas GnRHérgicas, se ha considerado la posibilidad de que la regulación estrogénica de la liberación de la GnRH sea además de manera indirecta, de manera directa a través de un mecanismo de acción genómico.

2.4 REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA GnRH POR CATECOLAMINAS

Una gran variedad de neuromoduladores están involucrados en la regulación del eje reproductivo, incluyendo las catecolaminas. Numerosos estudios han demostrado que en particular, la norepinefrina (NE) y la dopamina (DA) participan en el control de la secreción de gonadotropinas. La NE fue uno de los primeros neurotransmisores que se observaron involucrados en la regulación del pico preovulatorio de la LH (Sawyer et al., 1947; Sawyer et al., 1950; Sawyer, 1952). Se conoce que esta catecolamina ejerce un efecto estimulador sobre la secreción de la GnRH (Negro-Vilar, et al., 1979). Incluso, se ha observado que la NE se secreta en la circulación hipofisiaria de manera pulsátil y sincronizada con una alta correlación temporal con la liberación de la LH y la GnRH (Terasawa, et al., 1988). En cuanto al efecto de la dopamina sobre el eje reproductivo, no se ha determinado con precisión ya que existen numerosos estudios con resultados controversiales. Según el modelo de estudio y su condición fisiológica se observa estimulación, inhibición o ausencia de efecto sobre la secreción de la LH o la GnRH (ver Kordon, et al., 1994). Se ha demostrado que la administración intraventricular de DA tiene un efecto inhibitorio de la frecuencia pulsátil de la LH (Drouva y Gallo, 1976; Gnodde y Schuling, 1976; Gallo y Drouva, 1979; Gallo, 1984). Por otra parte, se ha reportado que la administración directa de DA sobre explantes hipotalámicos estimula la liberación de la GnRH (Nowak, 1985; Negro-Vilar, et al., 1979; Rotsztein, et al., 1977). Además, también existe controversia

en cuanto a los subtipos de receptores que median los efectos moduladores de estas catecolaminas sobre el eje reproductivo. Los estudios realizados *in vivo* o con explantes de tejido, solo coinciden parcialmente con los estudios realizados con líneas celulares inmortalizadas.

En general, los efectos de la norepinefrina son mediados por receptores $\alpha 1$, $\alpha 2$ y los β -adrenérgicos. Actualmente se han identificado tres subtipos de cada una de estas clases de receptores, cada uno de ellos codificado por un gen distinto. La familia de los receptores $\alpha 1$ incluyen a los subtipos $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, y $\alpha 1D$. Estos se encuentran asociados a proteínas G que activan la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés), resultando tras su activación la formación de diacilglicerol y trifosfato de inositol (IP3). Estas moléculas actúan como segundos mensajeros mediando la liberación de Ca^{2+} intracelular. Los tres subtipos de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos tienen diferentes eficiencias en la activación de la PLC. La familia de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos incluye a los subtipos $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ y $\alpha 2C$, los cuales se encuentran acoplados negativamente con las adenilato ciclasas, y por ende a la formación de AMPc. Finalmente, la familia de los receptores β -adrenérgicos incluyen los subtipos $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$, que se encuentran acoplados positivamente con actividad de las adenilato ciclasas (ver Siegel, et al., 1994; Guimaraes y Moura, 2001).

Los estudios en los que se analizan los efectos de la NE sobre la liberación de LH en animales ovariectomizados, muestran que los efectos resultantes no parecen ser mediados por receptores β -adrenérgicos, sino por receptores α -adrenérgicos, sin ser claro si son de las clases $\alpha 1$ o $\alpha 2$ -adrenérgicos (ver Kordon, et al., 1994). En cuanto a lo observado en células GT1, se conoce que la modulación de la liberación de la GnRH por NE es estimuladora y de manera dosis-dependiente. Sin embargo a diferencia de lo observado *in vivo*, se ha demostrado que este efecto es mediado por receptores $\beta 1$ -adrenérgicos acoplados positivamente a adenilato ciclasas (Martínez de la Escalera et al., 1992b; Findell et al., 1993; Uemura, et al., 1997), además de los receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos acoplados a PLC (Kreda, et al., 2001). También los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos han sido caracterizados en las células GT1, se demostró que son funcionales y que están acoplados a la inhibición de adenilato ciclasas (Lee, et al., 1995). Sin embargo, no se ha estudiado si estos receptores participan en la modulación de la secreción de la GnRH.

En cuanto a los efectos de la dopamina, en general son mediados a través de su interacción con dos grupos de receptores que son miembros de la familia de receptores ligados a proteínas G. Los tipo D1, los cuales están acoplados positivamente con la actividad de las adenilato ciclasas, y los tipo D2

que inhiben la actividad de estas enzimas (ver figura 3). Los dos subtipos de receptores dopaminérgicos fueron inicialmente identificados en base a criterios bioquímicos y farmacológicos. A partir del desarrollo de técnicas de biología molecular, como la secuenciación del DNA además de la secuenciación de los aminoácidos de una proteína, varios receptores del tipo D1 y D2 han sido identificados. Los receptores del tipo D1 incluyen los receptores D1 y D5 (o D1b); y en cuanto a los receptores del tipo D2 se conocen tres miembros, el D2, D3 y D4 (ver Siegel, et al., 1994).

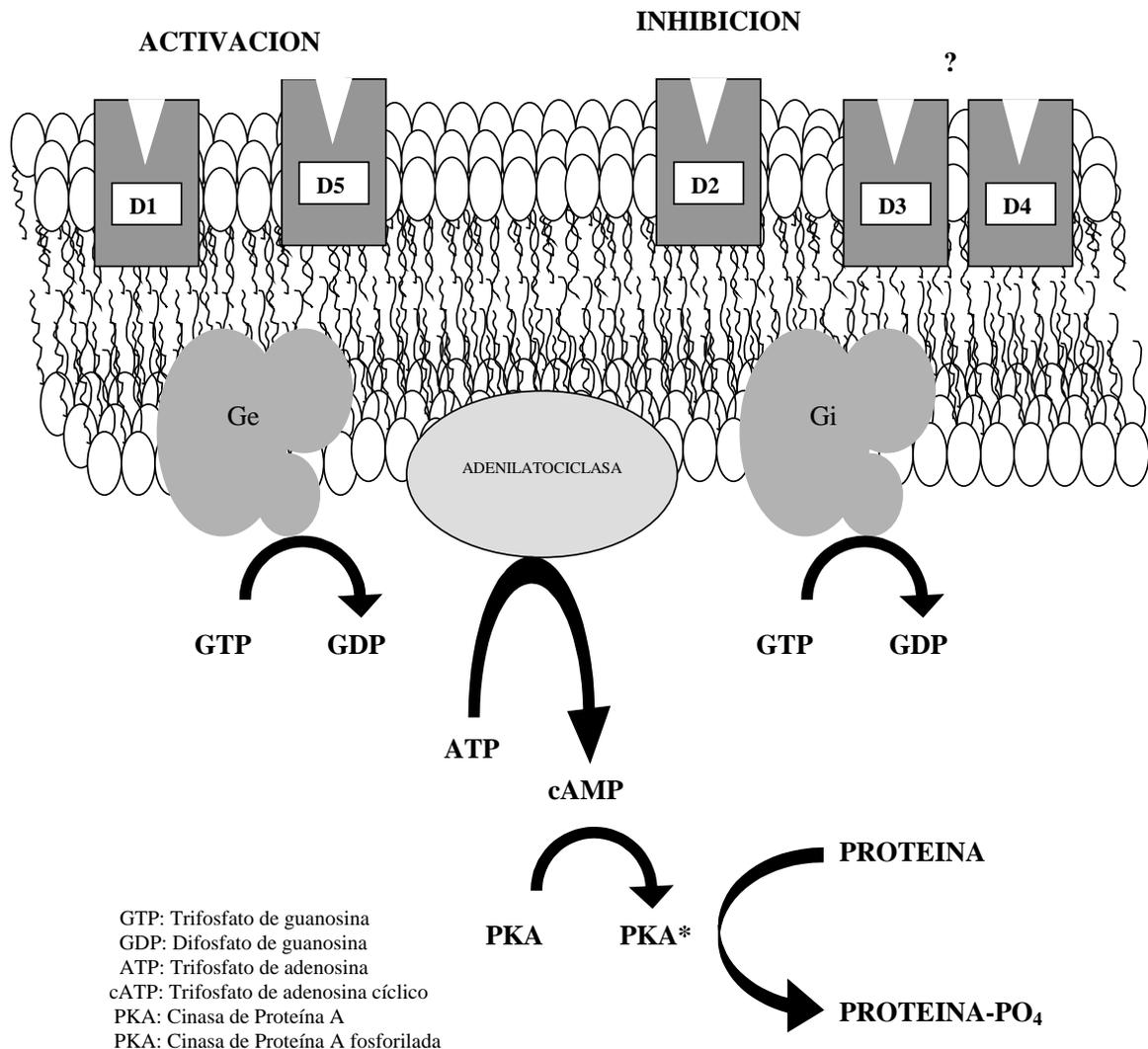


Figura 3. Efecto de la dopamina sobre la actividad de la enzima adenilato ciclasa. Hasta el momento se han identificado cinco subtipos de receptores dopaminérgicos. Los receptores D1 y D5 están acoplados a estimulación de la adenilato ciclasa. El receptor D2 está acoplado a la inhibición de esta enzima. La adenilato ciclasa cataliza la conversión de proteínas en fosfoproteínas. Los segundos mensajeros de los receptores D3 y D4 no han sido identificados (Modificado de Siegel, et al., 1994).

En células GT1, se conoce que la modulación de la liberación de la GnRH por esta catecolamina, al igual que en el caso de la NE, es estimuladora y de manera dosis-dependiente. La DA actúa a través del receptor D1-dopaminérgico acoplado positivamente a adenilato ciclasas (Martínez de la Escalera, et al., 1992c; Findell et al., 1993).

2.5 INTERACCIÓN DE ESTRÓGENOS, NOREPINEFRINA Y DOPAMINA SOBRE LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA GnRH

Debido al dogma en el que se consideró que no era posible la regulación estrogénica de las neuronas GnRHérgicas de manera directa, el estudio de este sistema fue enfocado a la identificación de células aferentes que comunicaran la señal estrogénica a las neuronas GnRHérgicas. Como resultado de estas investigaciones se han encontrado numerosas regiones cerebrales y neurotransmisores que son regulados por estrógenos, y que son importantes para la secreción de la GnRH. Entre estos se encuentran las aferencias adrenérgicas y dopaminérgicas. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha encontrado una alta densidad del RE α en neuronas adrenérgicas (Lee, et al., 2000). Por su parte, se ha observado que en ratas el tratamiento estrogénico que induce un decremento en el nivel de la LH sanguínea, simultáneamente reduce el nivel de NE en el área preóptica media. Lo cual sugiere que parte del mecanismo estrogénico de retroalimentación negativa se lleva a cabo mediante un decremento en la neurotransmisión por NE (Legan y Callahan, 1999). También en neuronas dopaminérgicas aferentes a neuronas GnRHérgicas, se ha detectado el RE α . Además, se ha observado que el número de contactos entre fibras de neuronas dopaminérgicas y neuronas GnRHérgicas es variable en función del ciclo estral (Mitchell, et al., 2003). Lo cual muestra que la regulación de las neuronas GnRHérgicas por DA es influenciada por estrógenos.

Actualmente también hay evidencia de efectos estrogénicos directos sobre neuronas GnRHérgicas que involucran modificaciones en la respuesta de estas células a señales adrenérgicas y dopaminérgicas. Existe la hipótesis de que la comunicación sináptica mediada por receptores a NE que modula la fisiología del eje reproductivo, es regulada por esteroides ováricos. Se propone que esta regulación consiste en un mecanismo multifacético, en el que los estrógenos amplifican la señal

adrenérgica mediante cambios en la expresión génica de los adrenoreceptores, además de interactuar a nivel de vías de transducción intracelulares (Etgen, et al., 2001; Alonso-Solis, et al., 1996).

Se han publicado múltiples estudios que muestran una modulación de la expresión génica de receptores adrenérgicos por estrógenos. Estos estudios han sido realizados en diversos sistemas, tanto *in vivo* como *in vitro*, entre los que se incluyen útero, glándula mamaria, y adipocitos cafés en cultivo, además del sistema nervioso central (Hatjis, et al., 1988; Marchetti y Labrie, 1990; Nimmo, et al., 1989; Monjo, et al., 2003; Karkanias, et al., 1997; Engstrom, et al., 2001). Particularmente en el hipotálamo, se ha observado que un tratamiento de estradiol por un periodo de 48 h, incrementa de cinco a seis veces la densidad de receptores $\alpha 1B$ -adrenérgicos del área preóptica. Además, esto se correlacionó con un incremento en los niveles del RNA mensajero correspondientes a este receptor (Karkanias, et al., 1996). Otras investigaciones apoyan la hipótesis de que la comunicación sináptica mediada por receptores adrenérgicos moduladores la fisiología del eje reproductivo es regulada por estrógenos. Algunos se basan en el análisis del efecto del estradiol sobre los niveles de AMPc inducidos por NE en explantes hipotalámicos. Se ha demostrado que la inducción de este segundo mensajero inducida por NE es modificada en respuesta al tratamiento estrogénico (Etgen y Petitti, 1987; Petitti y Etgen, 1990; Petitti, et al., 1992). En otro estudio se demostró que las células GT1-7 responden a concentraciones fisiológicas de 17β -estradiol reduciendo la acumulación de AMPc inducida por NE, pero no la inducida por la activación directa de la adenilato ciclasa. Estos resultados indican que las neuronas GnRHérgicas GT1, son moduladas directamente por estrógenos, causando éstos una desensibilización de adrenoreceptores (Martínez-Morales, et al., 2001).

También se ha observado que esteroides gonadales, particularmente estradiol, regulan la expresión de receptores dopaminérgicos. Se han identificado incrementos en la densidad de estos receptores en el cuerpo estriado (Di Paolo, et al., 1982) e hipófisis anterior de cerebros de rata (Pasqualini, et al., 1986). Incluso, al estudiar el control de la transcripción del gen correspondiente al receptor D1A dopaminérgico humano, mediante estimulación estrogénica en una línea celular que expresa este gen como es el neuroblastoma SK-N-MC, mediante deleciones en serie del extremo 5' del gen D1A se localizó un segmento que responde a estrógenos entre los nucleótidos -1472 y -1342 en relación con la metionina iniciadora. También se observó que esta región contiene la secuencia consenso del elemento de respuesta a estrógenos (ERE). Adicionalmente, las células SK-N-MC transfectadas con un vector de expresión del receptor a estrógenos, fueron tratadas con 17β -estradiol. Se observó un incremento del 20 % en el nivel de expresión del gen correspondiente al receptor D1A.

Esto demuestra una base molecular para la inducción de la transcripción del gen D1A por estrógenos, que podría formar parte del mecanismo de modulación de las funciones dopaminérgicas por esta hormona (Lee y Mouradian, 1999).

En base a estos reportes que muestran la presencia de receptores funcionales a estradiol en neuronas GnRHérgicas, incluyendo las células GT1, además de las investigaciones que han demostrado en diversos sistemas la regulación de algunos genes por efecto directo de estradiol, en el presente estudio se propone determinar la influencia del estradiol sobre la expresión génica en células GT1-7, particularmente sobre la expresión de dos tipos de receptores los β 1-adrenérgicos y D1-dopaminérgicos. Esto podría contribuir a la identificación del mecanismo a nivel molecular mediante el cual se regula la liberación de la GnRH.

3. JUSTIFICACIÓN

La determinación precisa del mecanismo a nivel molecular mediante el cual se efectúa la regulación de la liberación de la GnRH, podría ser la base para múltiples aplicaciones a nivel clínico, ya que partiendo de esta información se podrían enfrentar aspectos relacionados con la regulación de la ovulación. Además, la evaluación del efecto que ejerce el estradiol sobre los receptores adrenérgicos es de gran trascendencia, ya que estos receptores están implicados en sistemas fisiológicos que se han visto alterados por modificaciones hormonales, como por ejemplo en el sistema cardiovascular, entre muchos otros.

4. HIPÓTESIS

Si el 17β -estradiol ejerce un efecto directo sobre las neuronas GT1-7, la respuesta de éstas incluiría un cambio en la expresión de los genes que codifican para los receptores β 1-adrenérgicos y D1-dopaminérgicos, lo cual conllevaría a cambios en la actividad de liberación de la GnRH en respuesta a la señal aferente noradrenérgica y dopaminérgica.

5. OBJETIVO

Evaluar la influencia del 17β -estradiol a concentraciones de 0.1, 1.0 ó 10 nM por periodos de 6, 24 ó 48 h, sobre la expresión de receptores β 1-adrenérgicos y D1-dopaminérgicos en células GT1-7 mediante PCR cuantitativo en tiempo real.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO

En el presente trabajo se utilizó la línea celular GT1-7, entre los pases 17 y 25. Se cultivaron en cajas petri de 100 mm de diámetro (Costar Corporation) con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino y 10 µg/ml de penicilina/estreptomicina (GIBCO BRL). Los cultivos se mantuvieron dentro de una incubadora a 37 ° C, en alta humedad y una atmósfera de 5 % de CO₂ en aire. El medio de cultivo se cambió cada tercer día y las células se subcultivaron al llegar a una confluencia del 80 al 90 %. Esto último se realizó mediante una disociación con solución salina balanceada con tripsina al 0.05 % y EDTA-4 Na 0.53 mM (GIBCO BRL), seguida de centrifugación a 600 g por 5 minutos. Inmediatamente después el sedimento conteniendo las células fue resuspendido en D-MEM y estas fueron sembradas en nuevas cajas petri a menor densidad.

Con el objeto de evitar cualquier efecto debido a esteroides presentes en el suero, el medio de cultivo se sustituyó dos días antes del tratamiento por un medio de cultivo suplementado con un 10 % de suero fetal bovino tratado con carbón activado (HyClone).

El tratamiento consistió en aplicar 17-β-estradiol (Research Biochemicals Incorporated), disuelto en etanol a concentraciones de 0.1, 1.0 ó 10 nM por periodos de 6, 24 ó 48 h. El experimento fue realizado por triplicado. Se utilizó un grupo control por cada período de tratamiento, también por triplicado, a los cuales se les adicionó el volumen de etanol equivalente al contenido en cada tratamiento aplicado. Posteriormente, cada uno de los cultivos fue procesado de manera independiente.

6.2 EXTRACCIÓN DE RNA

Inmediatamente después del período de tratamiento estrogénico se procedió a extraer el RNA total de cada uno de los cultivos. La extracción de RNA se llevó a cabo mediante el uso de columnas con membranas de sílica (Absolutely RNA[®] RT-PCR Miniprep Kit, STRATAGENE). Para lo cual se extrajo completamente el medio de cultivo de cada caja petri y se adicionó una solución de lisis celular que contiene tiocianato de guanidina. Posteriormente se separaron los ácidos nucleicos del resto de estructuras celulares mediante la captura del RNA total en una membrana de sílica, y se lavó para remover contaminantes. Finalmente se sometió a un tratamiento con DNasas para eliminar la presencia de DNA genómico. El RNA total se eluyó de la membrana en agua libre de RNasas. El material así

extraído se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y se identificó por incorporación de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) para verificar su integridad. Finalmente fue cuantificado por espectrofotometría.

6.3 RETROTRANSCRIPCIÓN

A partir del RNA total extraído de cada uno de los cultivos de células GT1-7, se sintetizó una cadena complementaria de DNA (cDNA) mediante retrotranscripción (RT). Esta reacción se llevó a cabo por un periodo de 60 min a 42 °C, con una etapa previa de 5 min a 65 °C para desnaturalizar estructuras secundarias, y otra final de 3 min a 94 °C para inactivar a la enzima transcriptasa reversa. El volumen de la mezcla de reacción fue de 25 µl conteniendo 3 µg de RNA total, 5 µl amortiguador 5 X (Tris-HCl 250 mM pH8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM y DTT 50 mM), 200 nM de cada dNTP, 8 U de inhibidor de ribonucleasas RNasin (Promega), 400 nmol de un oligonucleótido iniciador dT y 50 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega). Para verificar la eficiencia de la RT se amplificó un fragmento de 850 pb correspondiente al gen de actina, un gen de expresión constitutiva.

6.4 PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL

El PCR cuantitativo (qPCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real es un método que incluye simultáneamente la amplificación y el análisis de la muestra, sin requerir que ésta sea manipulada. Actualmente existen diversos productos comerciales con los que se hace que el producto amplificado adquiera fluorescencia conforme transcurre la reacción. El presente trabajo fue realizado usando SYBR[®] Green, una molécula de bajo peso molecular que presenta afinidad por el DNA de doble cadena y al ser oxidado fluoresce. La fluorescencia emitida por el SYBR[®] Green es directamente proporcional al número de copias de DNA obtenido en cada ciclo del PCR y es monitoreada durante cada ciclo de la reacción. Debido a que en la primer fase del proceso de amplificación de un fragmento de DNA por PCR, todos los elementos químicos se encuentran en abundancia, la eficiencia de amplificación es muy cercana al 100%. Más importante aún, esta eficiencia de amplificación es constante para las diferentes muestras a analizar. Es en esta etapa en donde la concentración inicial de la muestra es directamente proporcional al número de ciclos requeridos para alcanzar una concentración final de muestra constante. Por el contrario, en la siguiente fase los oligonucleótidos iniciadores o el cDNA blanco comienzan a ser factores limitantes de la amplificación, por lo que la eficiencia disminuye. Hacia el final de la reacción de PCR la cantidad de productos obtenidos se

mantiene constante sin importar cuantos ciclos más se prolongue la reacción. En esta etapa es frecuente observar que muestras con diferentes concentraciones iniciales tengan el mismo número de copias al final de la reacción. En cierto punto de la reacción los productos de la amplificación acumulados son suficientes para superar la fluorescencia del ruido de fondo, lo cual es cuantificado como la máxima de la segunda derivada de la curva y se correlaciona con la cantidad inicial de muestra en la reacción de PCR, ya que al fijar un nivel de fluorescencia dentro de esta primer fase de la reacción (es decir, si fijamos el número de moléculas finales), entonces el número de ciclos que fueron necesarios para que la fluorescencia alcance este valor fijo, será inversamente proporcional a la concentración inicial de moléculas. Este punto es denominado C_p (por sus siglas en ingles de crossing point). El software del sistema reporta automáticamente los valores de C_p , los cuales se pueden utilizar para llevar a cabo cuantificaciones absolutas o relativas.

El número de copias relativas entre dos muestras (experimental y control) puede ser determinado por la diferencia de sus valores de C_p . Debido a que el PCR es un proceso exponencial, el número de copias relativo es equivalente a la eficiencia del PCR elevado a la potencia de la diferencia de los valores de C_p de las dos muestras a comparar. Para los cálculos se supone que la eficiencia de la reacción es igual entre muestras y es del 100 %. Por ser una reacción exponencial, una eficiencia del 100 % duplica la cantidad de productos en cada ciclo de la reacción, por lo que se le atribuye un valor de 2. Por otra parte, debido a que es muy difícil mantener cantidades exactas de DNA en diferentes muestras, los resultados del gen a cuantificar deberán ser normalizados con una referencia, para lo cual se emplea un gen presuntamente invariable. En base a esto los cálculos a realizar se efectúan de la siguiente manera: Primero, para normalizar las concentraciones de cDNA se obtiene la diferencia entre los valores de C_p de la muestra y los valores de C_p del gen constitutivo. Al dato obtenido se le nombra ΔC_p . Posteriormente se calcula la diferencia entre ΔC_p del grupo tratado y el grupo control, obteniendo el dato denominado $\Delta\Delta C_p$. Posteriormente se obtiene la cantidad relativa elevando 2 al negativo del $\Delta\Delta C_p$ negativo (ver tabla 1) (Bernard y Wittwer, 2002).

$$\Delta C_p = C_{p \text{ muestra}} - C_{p \text{ gen constitutivo}}$$

$$\Delta\Delta C_p = \Delta C_{p \text{ tratado}} - \Delta C_{p \text{ control}}$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-(-\Delta\Delta C_p)}$$

Previamente a la realización del PCR cuantitativo (qPCR), se optimizaron las condiciones de reacción. Se procedió a determinar la temperatura media de hibridación adecuada para el PCR convencional de los oligonucleótidos iniciadores a utilizar (sus características se describen en la tabla 2), mediante PCR con gradiente de temperatura en un rango de 52.9 a 67.6 °C. Para esto, fue utilizado un cDNA de células GT1-7 sin tratamiento. Para la cuantificación por qPCR se utilizó el LightCycler™ (Roche Biochemicals). Cada mezcla de reacción contenía 1 µl de cDNA, 0.6 µl de oligonucleotidos sentido y antisentido en una concentración 4 uM, 6 µl de la mezcla de reacción SYBR® Green taq Ready Mix™ SIGMA y 4.4 µl de agua, teniendo un volumen total de 12 µl. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: Un ciclo de 30 seg a 94° C para activar la enzima polimerasa mediante la desnaturalización del anticuerpo acoplado (hot start), después 25 seg a 94° C, 10 seg a 57°C (para oligonucleotidos específicos del receptor D1-dopaminérgico) o 62° C (para oligonucleotidos específicos del receptor β1-adrenérgico) y 10 seg a 72° C por 45 ciclos. Finalmente, un ciclo de transición de 65 a 94° C para determinar la especificidad del producto amplificado. La especificidad de la amplificación se evalúa mediante una curva de disociación. Para lo cual se realizaron mediciones continuas de la fluorescencia abarcando un rango de temperaturas que inicia a partir de 65°C hasta 94°C. De esta manera es posible identificar la temperatura en la que se disocian las cadenas de DNA correspondientes al producto amplificado, esta temperatura es específica para cada fragmento de DNA según su tamaño y secuencia. Este dato permite identificar la presencia de dímeros, amplificaciones inespecíficas o mutaciones puesto que al graficarse se observarían varios picos de disociación. Asimismo, se presentara solamente un pico de disociación si se trata de un

producto único. El software del sistema LightCycler™ lleva a cabo automáticamente este proceso de detección construyendo una gráfica de la detección de fluorescencia en función de la temperatura.

Para normalizar la concentración de cDNA utilizada, se procedió a cuantificar la expresión del gen constitutivo, β -actina. Los nucleótidos iniciadores utilizados para esta reacción se describen en la tabla 2. Se utilizaron las mismas condiciones de reacción que para la amplificación de los receptores a cuantificar.

| OLIGONUCLEOTIDOS DISEÑADOS | | | | | | |
|---------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| OLIGONUCLEOTIDO | β 1-adrenérgico | | D1-dopaminérgico | | β -Actina | |
| | Sentido | Antisentido | Sentido | Antisentido | Sentido | Antisentido |
| TAMAÑO (pb) | 22 | 22 | 22 | 22 | 21 | 21 |
| TEMPERATURA MEDIA DE HIBRIDACIÓN (Teórica) | 60.40 | 60.40 | 60.43 | 59.59 | | |
| TEMPERATURA MEDIA DE HIBRIDACIÓN (Práctica) | 62 | | 57 | | 57 | |
| % GC | 54.55 | 50 | 45.45 | 45.45 | 50 | 50 |
| SECUENCIA (5'-3') | gagctctgga- cttcgtagatg | gcagctgtcg- atcttctttacc | ccaaggtga- ccaacttcttgt | tcacacaga -gggtaaggatgga | ccatcatgaagtgt gacgttg | acagagtacttgcg ctcagga |
| TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb) | 390 | | 183 | | 173 | |

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los receptores β 1-adrenérgico y D1-dopaminérgico.

Para validar los ensayos de qPCR una vez estandarizados, se procedió a realizar el análisis comúnmente denominado “Rango dinámico de detección”. Mediante este análisis se determina la eficiencia de amplificación en un ensayo de PCR específico y el nivel de sensibilidad. Este análisis consiste en la preparación de diluciones seriales del blanco a cuantificar (en este caso cDNA), las cuales se someten a la reacción de PCR que previamente se ha estandarizado. A partir del resultado de este ensayo se evalúan dos parámetros; la correlación lineal entre las muestras y la pendiente entre el número de ciclos contra el logaritmo decimal de la concentración de estas. La correlación lineal entre las muestras determina que existe una buena correlación entre la concentración inicial de la muestra y el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral de detección. Esta relación es establecida automáticamente por el software de análisis y determina el número menor de copias que puede ser detectado en dicho ensayo. En cuanto a la pendiente entre el número de ciclos contra el logaritmo decimal de la concentración, es útil para determinar la eficiencia de amplificación, la cual es igual a 10 elevado a la potencia del residuo de -1 entre el valor de la pendiente (ver tabla 3) (Bernard y Wittwer, 2002). Este dato puede expresarse en porcentaje, considerando que un valor de 2 equivale a un 100 % de eficiencia, puesto que la reacción de PCR es exponencial.

$$E = 10^{-1/\text{Pendiente}}$$

Tabla 3. Formula para determinar la eficiencia de amplificación de un ensayo de PCR, a partir del valor de la pendiente entre el número de ciclos contra el logaritmo decimal de la concentración.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan de manera relativa al grupo control, por lo que éste fue normalizado a uno y no presenta varianza entre muestras. Por las características de los datos, éstos fueron analizados mediante la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis One-Way ANOVA. En caso de diferencias significativas se compararon los grupos de pares utilizando el análisis para datos independientes Mann-Whitney U-Test. Los datos con $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

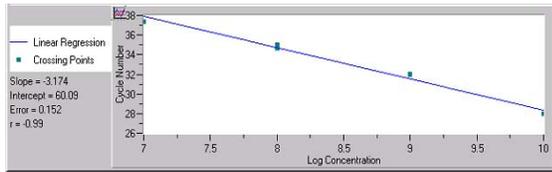
En esta sección se muestran los resultados de la cuantificación de la expresión génica, la cual fue evaluada mediante qPCR en tiempo real, como se detalla en la metodología. En seguida se describen los resultados correspondientes a la estandarización de esta metodología, y posteriormente los resultados del análisis cuantitativo de la expresión génica de los receptores β 1-adrenérgicos y D1-dopaminérgicos por efecto del tratamiento estrogénico en las células GT1-7.

7.1 ESTANDARIZACIÓN DE qPCR EN TIEMPO REAL

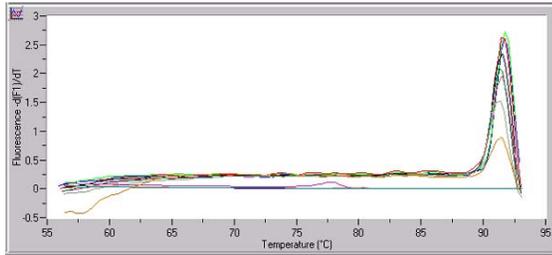
Después de determinar la temperatura media de hibridación para el PCR de los oligonucleótidos iniciadores específicos para la amplificación de los receptores β 1-adrenérgico (β 1-AR), y D1-dopaminérgico (D1-DR), además del gen constitutivo β actina, se procedió a validar los ensayos de qPCR en tiempo real. Para lo cual se realizó el análisis comúnmente denominado “Rango dinámico de detección”, como se detalla en la metodología. Mediante este análisis se determinó que la eficiencia de amplificación en cada ensayo de PCR fue cercana al 100%. En la figura 7.1 se muestra el resultado de las amplificaciones de diluciones seriales de un blanco a cuantificar (en este caso cDNA de células GT1-7), las cuales se sometieron a las reacciones de PCR que previamente fueron estandarizadas. En las imágenes A, B y C, se muestra que hay una correlación lineal entre las diluciones seriales, y en D la eficiencia de reacción expresada en porcentaje de cada una de las reacciones. A su vez, la especificidad de la amplificación fue evaluada mediante una curva de disociación. Ya que la temperatura en la que se disocian las cadenas de DNA correspondientes al producto amplificado es específica para cada fragmento de DNA según su tamaño y secuencia, al registrar la disociación de la doble cadena de DNA en función de la temperatura, es posible identificar amplificaciones inespecíficas, puesto que al graficarse se observarían varios picos de disociación. Por el contrario, si se trata de un producto único se presentará solamente un pico de disociación. Como se puede observar también en la figura 7.1 en las imágenes A', B' y C' en donde se grafica la derivada de la fluorescencia en función de la derivada de la temperatura, para cada una de las reacciones de PCR la especificidad de los productos amplificados fue la esperada. En cada una de las reacciones se observó una sola temperatura de disociación, indicando así que se generó únicamente un producto de amplificación. Esto se observó tanto en las reacciones para los genes a cuantificar como para el gen constitutivo. En

el caso de la imagen B', que muestra la temperatura de disociación del producto de PCR correspondiente al D1-DR, se observa una mínima señal de disociación entre los 70 y 75 ° C. Las señales emitidas en este rango de temperatura comúnmente son artefactos, como dímeros de oligonucleótidos iniciadores. Para confirmar lo anterior, se realizó una electroforesis en gel de agarosa con tres muestras que presentaron esta señal. Y como se puede observar en la imagen B'' de la figura 7.1, únicamente se encuentra el producto de 183 pb, lo cual indica que no hubo amplificaciones específicas. En estas gráficas de temperatura de disociación también se puede apreciar que las muestras correspondientes a las reacciones del control negativo, en las cuales se utilizó como plantilla RNA, no presentan el pico de disociación, lo cual indica que no hubo amplificación alguna. Por lo tanto, los fragmentos amplificados fueron consecuencia de expresión génica (proviene de RNA mensajero retrotranscrito a cDNA) y no por contaminación con DNA genómico.

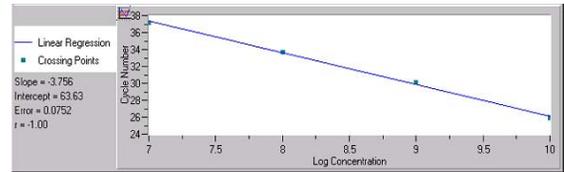
A. Regresión lineal β 1-AR



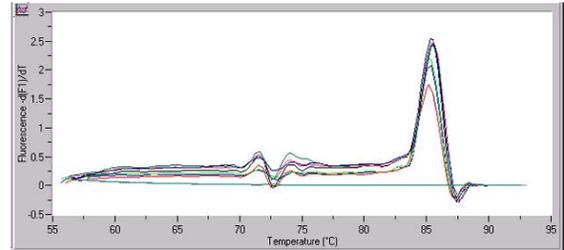
A'. Temperatura de disociación



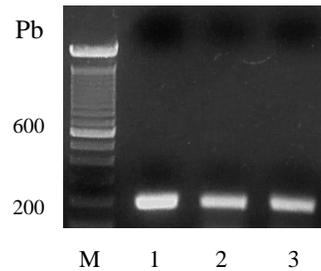
B. Regresión lineal D1-DR



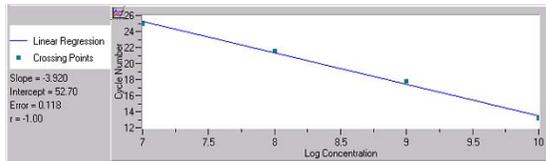
B'. Temperatura de disociación



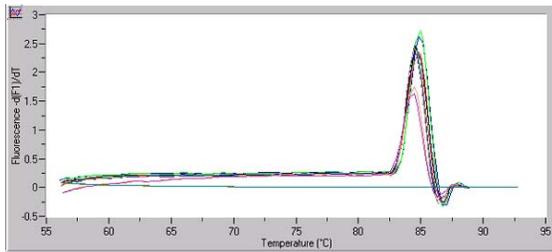
B'' Electroforesis de productos de qPCR D1-DR.



C. Regresión lineal β actina



C'. Temperatura de disociación



D. Eficiencia de reacción.

| REACCION DE PCR | PENDIENTE | % DE EFICIENCIA |
|-----------------|-----------|-----------------|
| β 1-AR | -3.174 | 100 |
| D1-DR | -3.756 | 92.5 |
| β actina | -3.92 | 90 |

Figura 7.1. Validación de los ensayos de qPCR en tiempo real mediante el análisis comúnmente denominado “Rango dinámico de detección”. Se prepararon diluciones seriales del blanco a cuantificar (en este caso cDNA de células GT1-7), las cuales se someten a la reacción de PCR que previamente se ha estandarizado. Se utilizó un LightCycler™ (Roche Biochemicals) y SYBR® Green como indicador. A. Regresión lineal del ensayo de PCR para la amplificación de un fragmento de 390 pb correspondiente al gen del receptor β 1-adrenérgico (β 1-AR), muestra una pendiente de $y = -3.174$. A'. Temperatura de disociación del fragmento correspondiente al β 1-AR, la cual fué cercana a los 90°C . B. Regresión lineal del ensayo de PCR para la amplificación de un fragmento de 183 pb correspondiente al gen del receptor D1-dopaminérgico (D1-DR), muestra una pendiente de $y = -3.756$. B'. Temperatura de disociación del fragmento correspondiente al D1-DR, la cual fue cercana a los 85°C . C. Regresión lineal del ensayo de PCR para la amplificación de un fragmento de 173 pb correspondiente al gen constitutivo β actina, muestra una pendiente de $y = -3.920$. C'. Temperatura de disociación del fragmento correspondiente al β actina, la cual fue cercana a los 85°C . C''. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g/ml}$) del producto de qPCR en tiempo real correspondiente al D1-DR. En donde M: Marcador, 1, 2 y 3: muestras analizadas. D. Se muestra la eficiencia de reacción para cada una de las reacciones expresada en porcentajes, los receptores β 1-AR, D1-DR y para el gen constitutivo β actina.

7.2 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

En el presente estudio se obtuvieron resultados que apoyan la hipótesis planteada, en la que se propone que el estradiol regula de manera directa las neuronas GnRHérgicas GT1-7 mediante un mecanismo genómico. Los resultados muestran que existe un incremento en la expresión génica de los receptores β 1-adrenérgicos y D1-dopaminérgicos por efecto del tratamiento estrogénico en estas células GT1-7.

Primeramente, cabe aclarar que es posible considerar que los datos obtenidos son confiables para calcular de manera cuantitativa los niveles de RNA mensajeros estudiados. Esto puesto que las reacciones de PCR no presentaron amplificaciones inespecíficas y no contenían contaminación por DNA genómico. En la figura 7.2 se muestran las temperaturas de disociación correspondientes a las reacciones mediante las cuales se cuantificó la expresión de los genes estudiados en los cultivos de células GT1-7 con el tratamiento estrogénico. En estas gráficas se puede apreciar que las muestras correspondientes a las reacciones de control negativo, en las cuales se utilizó como plantilla RNA, no presentan el pico de disociación, lo cual muestra que no hubo amplificación alguna, lo que a su vez indica ausencia de DNA.

Al analizar la expresión del receptor β 1-adrenérgico en los cultivos de neuronas GT1-7, se observó un incremento dosis dependiente a las 6 h del tratamiento con 17β -estradiol. En la figura 7.3 A se muestran las cantidades relativas del RNA mensajero correspondiente al receptor β 1-adrenérgico, en células tratadas con dosis de 0.1 a 10 nM de 17β -estradiol por 6 h, lo cual se expresa en el eje de las x como expresión relativa. De acuerdo a la prueba estadística Kruskal-Wallis One-Way ANOVA, hay diferencia estadísticamente significativa entre grupos ($P = 0.033$). Y mediante el análisis estadístico para datos independientes Mann-Whitney U-Test, se determinó que los grupos tratados con la dosis de 1.0 ó 10 nM presentan un incremento significativo al compararse con el grupo control ($P < 0.05$). Este incremento en la expresión génica fue hasta de 2.37 veces respecto al grupo control sin tratamiento. Este efecto no se presenta a las 24 h de tratamiento, como se aprecia en la figura 7.3 B. Sin embargo, a las 48 h de tratamiento también se tiene un incremento estadísticamente significativo por efecto del tratamiento estrogénico de mayor dosis (Fig 7.3 C), 1.22 veces mayor respecto al control no tratado.

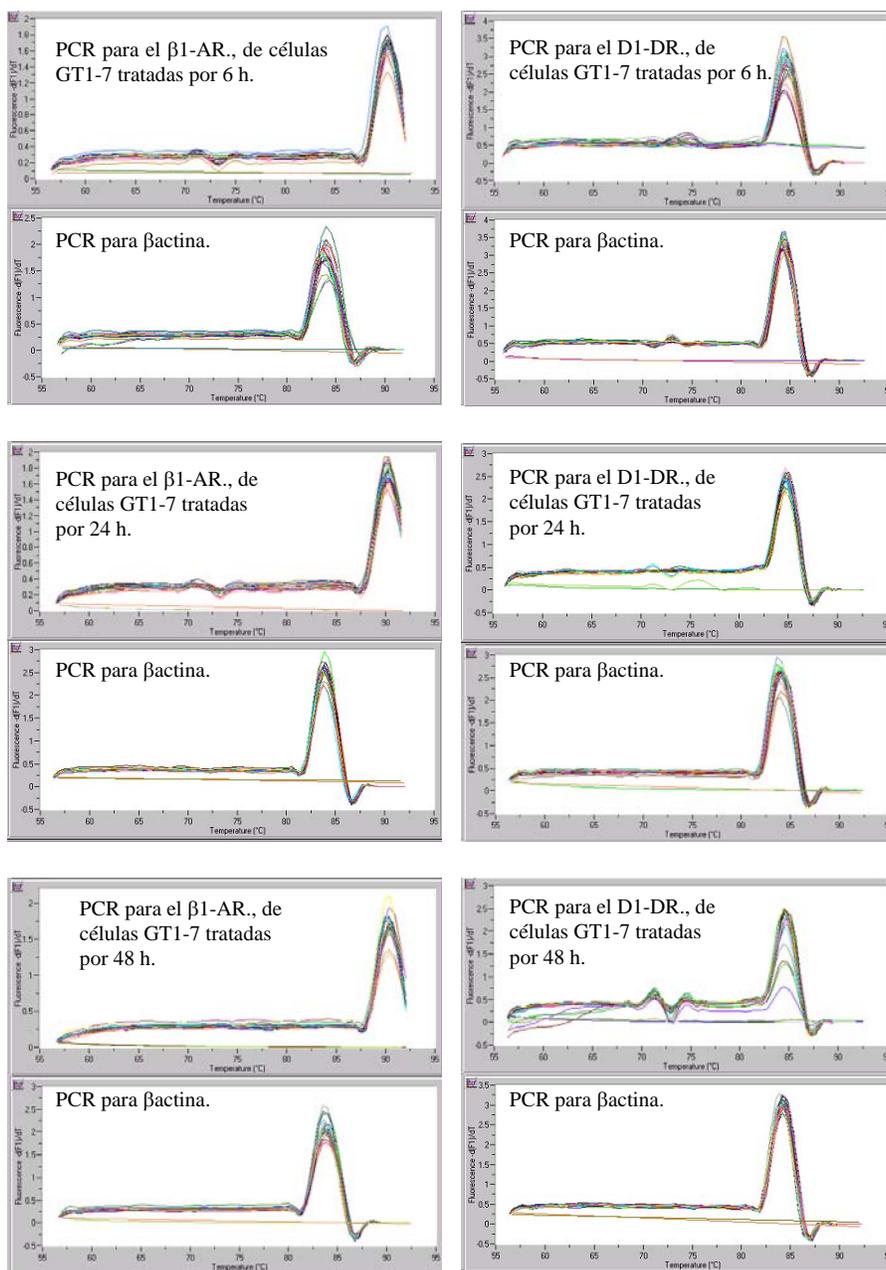


Figura 7.2. Picos de disociación de los productos amplificados para la cuantificación de los receptores $\beta 1$ -adrenérgicos ($\beta 1$ -AR) y D1-dopaminérgicos (D1-DR), y de la amplificación del gen constitutivo β actina, lo cual fue obtenido mediante un ciclo de transición de 65 a 94° C al final de los ciclos de PCR. La reacción fue monitoreada por lectura de la flourescencia emitida por el SYBR® Green incorporado al producto.

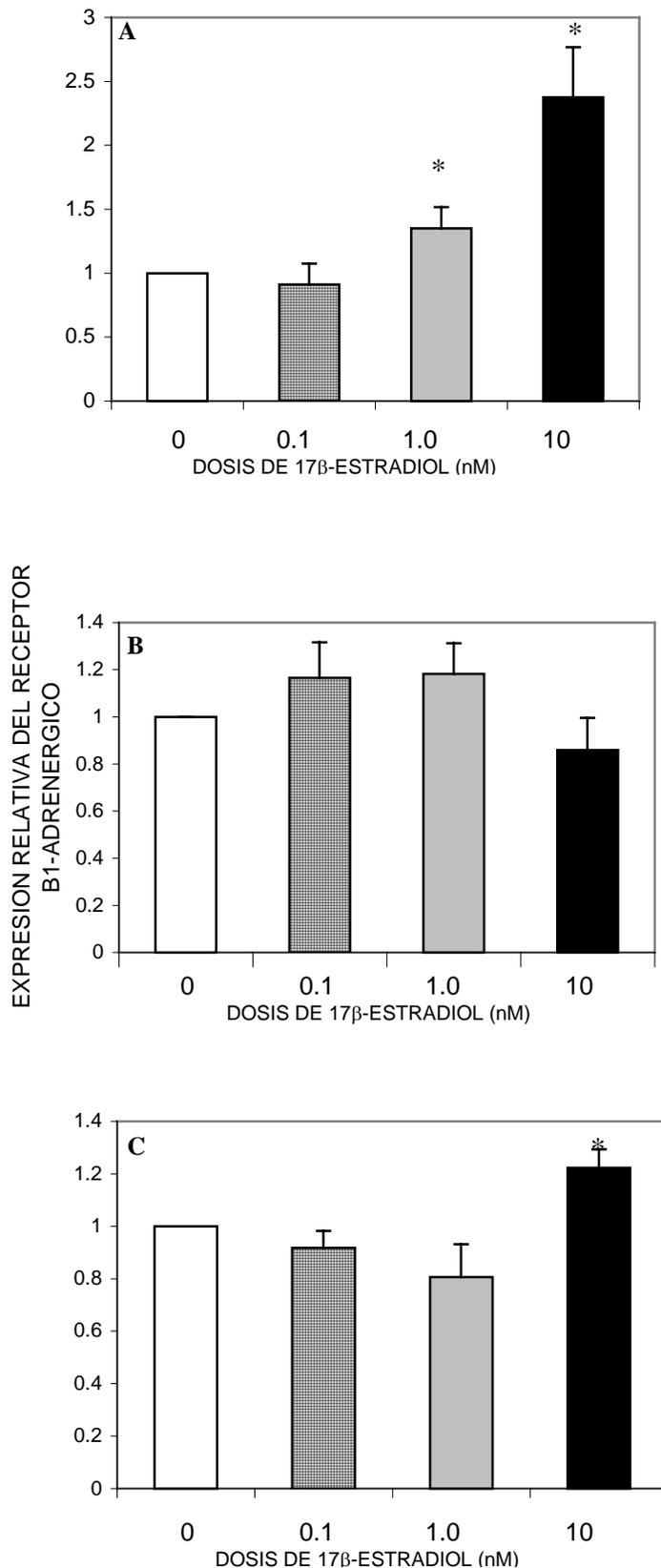


Figura 7.3. Incremento en la expresión de receptores β 1-adrenérgicos por efecto de estradiol en células GT1-7. Cultivos de células GT1-7 fueron tratados por 6, 24 y 24 h (A, B, y C respectivamente) con 17 β -estradiol (0.1, 1.0 ó 10 nM). La expresión del gen del receptor β 1-adrenérgico fue analizada por PCR en tiempo real, mediante la amplificación de un fragmento de 390 pb en un LightCycler™ (Roche Biochemicals) con SYBR® Green como indicador. En cada gráfica se muestran los promedios de una determinación por triplicado \pm el error estándar. La columna marcada con * presenta una diferencia estadísticamente significativa al compararse con el grupo control ($P < 0.05$). Los cálculos fueron realizados utilizando el método para determinación de expresión relativa por PCR en tiempo real denominado $\Delta\Delta C_t$.

La expresión del receptor D1-dopaminérgico también es incrementada por efecto estrogénico de forma dosis dependiente. A las 6 h de tratamiento se obtuvo un incremento de 2.23 veces, estadísticamente significativo ($P < 0.05$) en la expresión de este receptor por efecto del 17β -estradiol 1.0 nM (fig. 7.4 A); un incremento semejante (2.4 veces) se observa con la dosis de 10 nM sin ser estadísticamente significativo por tener un error estándar muy grande. De acuerdo al análisis estadístico, este efecto no se presentó a las 24 y 48 h de tratamiento estrogénico (fig 7.4 B y C respectivamente). Sin embargo, en el tratamiento por 24 h se presenta una tendencia a incrementar la expresión de este receptor en función de la concentración.

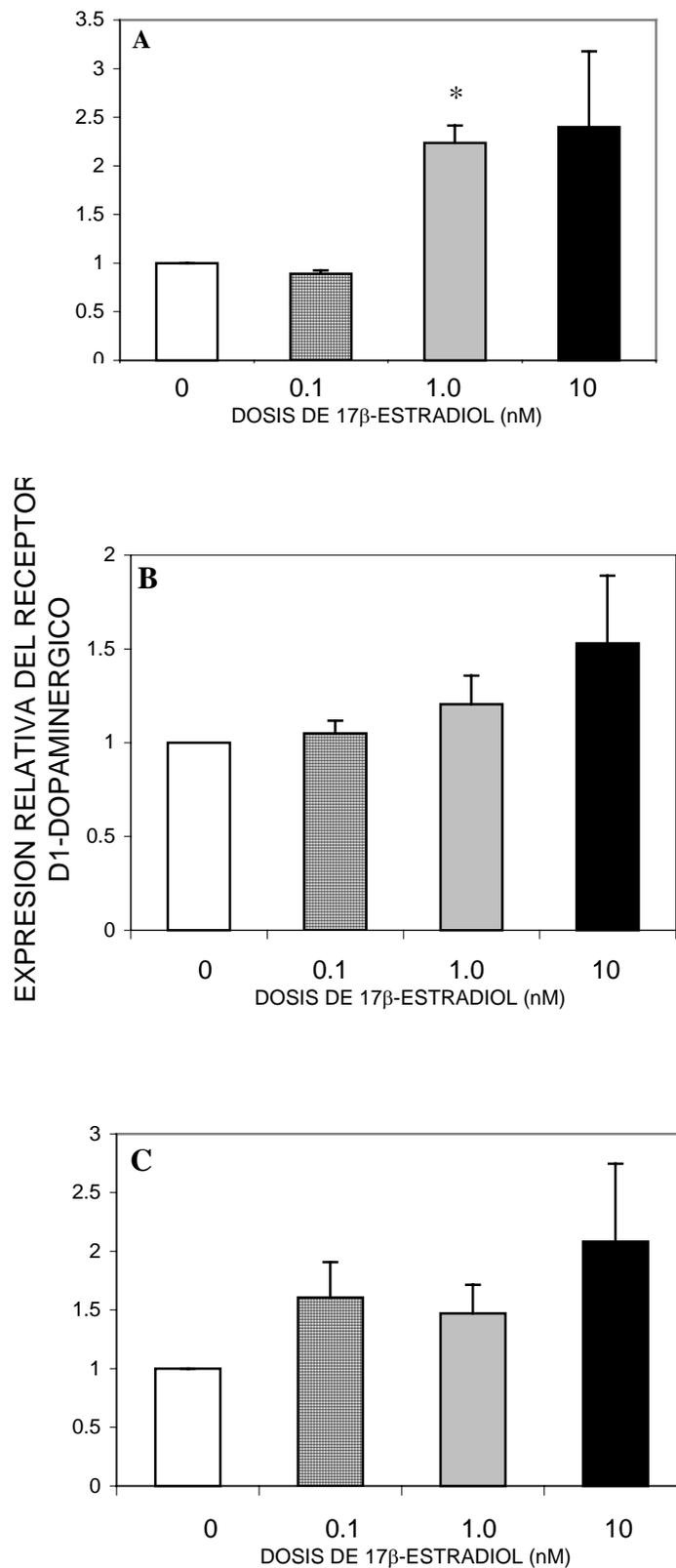


Figura 7.4. Nivel de expresión de receptores D1-dopaminérgicos por efecto de estradiol en células GT1-7. Cultivos de células GT1-7 fueron tratados por 6, 24 y 24 h (A, B, y C respectivamente) con 17β-estradiol (0.1, 1.0 ó 10 nM). La expresión del gen del receptor D1-dopaminérgico fue analizada por PCR en tiempo real, mediante la amplificación de un fragmento de 183 pb en un LightCycler™ (Roche Biochemicals) con SYBR® Green como indicador. En cada gráfica se muestran los promedios de una determinación por triplicado ± el error estándar. Los cálculos fueron realizados utilizando el método para determinación de expresión relativa por PCR en tiempo real denominado ΔΔCt.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se planteó como hipótesis que el 17β -estradiol regula de manera directa la expresión génica de los receptores $\beta 1$ -adrenérgicos y D1-dopaminérgicos en células GT1-7. Esta acción podría formar parte del mecanismo de retroalimentación por el cual el estradiol regula la liberación de la GnRH. Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan esta hipótesis, puesto que la expresión de ambos genes resultó ser modulada por el tratamiento estrogénico aplicado.

Estos resultados refuerzan las evidencias que apoyan al concepto de que el estradiol ejerce una acción directa sobre las neuronas GnRHérgicas. Es bien conocido que los estrógenos ejercen una influencia importante sobre la fisiología de las neuronas GnRHérgicas, y finalmente sobre la fertilidad. Sin embargo, esto todavía es un punto controversial en la neuroendocrinología de la reproducción, en cuanto a cómo y en dónde actúan las hormonas esteroides para ejercer sus efectos de retroalimentación negativa o positiva (ver Melcangi et al., 2002).

Mientras que los mecanismos indirectos de los estrógenos mediante los cuales regulan la secreción de la GnRH han sido bien estudiados (ver Petersen, et al., 2003; Herbison, 1998; Herbison y Pape, 2001), los efectos estrogénicos directos sobre las neuronas GnRHérgicas no fueron considerados durante mucho tiempo. Esto ocurrió debido a que era clásicamente aceptado que las neuronas GnRHérgicas no expresaban receptores a estas hormonas, o que éstos se presentaban en cantidades muy limitadas (Shivers et al, 1983; Fox, et al., 1990; Herbison y Theodosis, 1992; Huang y Harlan, 1993; Lehman y Karsch, 1993). Sin embargo, con el descubrimiento de un segundo receptor a estrógenos denominado receptor a estrógenos β (RE β) (Kuiper, et al., 1996), la biología de los estrógenos en general se vio forzada a ser reevaluada. Entre otros aspectos se consideró la posibilidad de que el RE β se encontrara en las neuronas GnRHérgicas, por lo que fue analizada y posteriormente demostrada la expresión de receptores funcionales a estrógenos del tipo RE β en estas células (Skynner, et al, 1999; Herbison, et al, 2001; Hrabovszky et al., 2001). Al estudiar líneas celulares inmortalizadas de neuronas GnRHérgicas como las células GT1, se encontró que éstas expresan los transcritos correspondientes a ambos receptores, RE β y RE α , y que presentan estas proteínas funcionales (Poletti, et al., 1994; Radovick, et al., 1994; Shen, et al., 1998; Roy et al., 1999; Kallo, et al, 2001). Esto sugirió que los esteroides gonadales pueden influir directamente sobre células GnRHérgicas. Los efectos directos de los estrógenos sobre neuronas GnRHérgicas actualmente reportados, incluyen biosíntesis, secreción y degradación de la GnRH, biosíntesis de galanina,

modificación de la actividad eléctrica y cambios ultraestructurales de estas neuronas (ver Herbison, 1998) a los que se suman los resultados del presente estudio. De tal forma que se está construyendo el andamiaje para que sea aceptado este mecanismo de acción estrogénica directa. Esto se refleja en el incremento de investigaciones recientes enfocadas al estudio de este tipo de acción estrogénica, las cuales incluyen el análisis tanto de efectos genómicos como no genómicos (ver Petersen, et al., 2003).

La norepinefrina (NE) fue uno de los primeros neurotransmisores que se encontraron involucrados en la regulación del pico preovulatorio de la LH (Sawyer et al., 1947; Sawyer, 1950; Sawyer, 1952). En cuanto a lo observado en células GT1, se conoce que la modulación de la liberación de la GnRH por NE es estimuladora y de manera dosis-dependiente. Se ha demostrado que este efecto es mediado a través de receptores β 1-adrenérgicos acoplados positivamente a adenilato ciclasas (Martínez de la Escalera et al., 1992b; Findell et al., 1993; Uemura, et al., 1997), además de los receptores α 1-adrenérgicos acoplados a PLC (Kreda, et al., 2001). También los receptores α 2-adrenérgicos han sido caracterizados en las células GT1, en las que se demostró que son funcionales y que están acoplados a la inhibición de adenilato ciclasas (Lee, et al., 1995). Sin embargo, no se ha estudiado si estos receptores participan en la modulación de la secreción de la GnRH.

Por su parte, se ha estudiado la posible interacción de otros factores moduladores del eje reproductivo sobre la señal adrenérgica que regula este mismo sistema, como lo son las hormonas esteroides, particularmente los estrogénos. Entre los efectos estrogénicos indirectos sobre la regulación de la secreción de la GnRH, se encuentra la modulación de la aferencia adrenérgica. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha encontrado una alta densidad del RE α en neuronas adrenérgicas (Lee, et al., 2000), además de haberse observado que en ratas el tratamiento estrogénico que induce un decremento en el nivel de la LH sanguínea, simultáneamente reduce el nivel de NE en el área preóptica medial. Por todo ello, se ha sugerido que parte del mecanismo estrogénico de retroalimentación negativa se lleva a cabo mediante un decremento en la neurotransmisión por NE (Legan y Callahan, 1999).

También hay evidencia de efectos estrogénicos directos sobre neuronas GnRHérgicas que involucran modificaciones en la respuesta de estas células a señales adrenérgicas. Nosotros proponemos la hipótesis de que la comunicación sináptica mediada por receptores a NE que modula la fisiología del eje reproductivo es regulada por efecto de esteroides ováricos, mediante la amplificación de la señal adrenérgica a través de cambios en la expresión génica de los adrenoreceptores. En forma

consistente, otros grupos proponen que esta regulación involucraría también un mecanismo a nivel de vías de transducción intracelulares (Etgen, et al., 2001; Alonso-Solis, et al., 1996). En el presente estudio se encontró un efecto estrogénico sobre la expresión del receptor β 1-adrenérgico, el cual consiste en un incremento en la expresión del gen correspondiente a este receptor. Esto coincide con otros estudios que muestran este mismo efecto en diversos sistemas tanto *in vivo* como *in vitro*, entre los que se incluyen útero, glándula mamaria, y adipocitos cafés en cultivo, además del sistema nervioso central (Hatjis, et al., 1988; Marchetti y Labrie, 1990; Nimmo, et al., 1989; Monjo, et al., 2003; Karkanias, et al., 1997; Engstrom, et al., 2001).

Es importante considerar que en este estudio únicamente se determinó el nivel de transcripción, lo cual es un indicio de un posible efecto a nivel de la síntesis protéica, que hasta no ser evaluado directamente no es posible afirmar. En este estudio en particular, es aún mas importante esta consideración, ya que se ha reportado que los esteroides pueden afectar la síntesis de proteínas actuando a nivel de la traducción (Verdi y Campagnoni, 1990). De ser proporcional el incremento en la expresión génica con el incremento en la expresión proteica del receptor estudiado, el resultado final sobre el eje reproductivo sería un aumento en la trasmisión sináptica adrenérgica del receptor, y por ende en la secreción de la GnRH por efecto estrogénico. Éste, sería un mecanismo consistente con la retroalimentación positiva mediante el cual los estrógenos gonadales regulan la secreción de la GnRH actuando de manera directa sobre las neuronas GnRHérgicas a través de un mecanismo genómico.

Sin embargo, el circuito que controla la fertilidad es un sistema complejo, por lo que es de esperarse que otros factores intervengan en el mecanismo planteado. Por otra parte, es importante considerar que las hormonas esteroides son moléculas capaces de causar diversos efectos en un mismo sistema mediante una gran variedad de mecanismos (ver Flakenstein, et al, 2000). Por lo tanto, será necesario determinar el efecto integral sobre la función de estos receptores, ya que mediante mecanismos no genómicos, podría afectar la activación de las vías de transducción que hacen posible que la señal adrenérgica produzca un efecto en la célula. Estudios en diversos sistemas han demostrado que el estradiol induce una desensibilización de los β -adrenoreceptores (Engstrom, et al., 2001). Hay evidencias que indican que esta desensibilización se debe a un desacoplamiento de los adrenoreceptores de sus proteínas G. En explantes hipotalámicos, se ha demostrado que el estradiol estabiliza el estado fosforilado de los adrenoreceptores mediante el cual éstos son desacoplados de su proteína G, de tal forma que se inhibe la defosforilación para un posterior acoplamiento (Ansonoff y Etgen, 2000). Además, también es indispensable determinar con precisión la participación de otros

receptores adrenérgicos en esta línea celular, y el efecto estrogénico sobre éstos. Así como se ha reportado que el estradiol actúa desensibilizando receptores β -adrenérgicos, también se ha demostrado que esta misma hormona incrementa la respuesta a la señal adrenérgica mediada por receptores α 1-adrenérgicos en explantes hipotalámicos. Este efecto se debe a un incremento en la expresión de receptores α 1B-adrenérgicos a las 24 y 48 horas del tratamiento estrogénico (Petitti y Etgen, 1990; Karkanias, et al., 1996). De tal manera que, el efecto final estrogénico sobre la estimulación de la secreción de la GnRH, dependerá de la integración de todas las modificaciones que los estrógenos efectúen sobre cada una de las familias de receptores adrenérgicos. Estos efectos podrían ser tanto a nivel de expresión génica, como a nivel de acoplamiento de sus vías de transducción. En un estudio se demostró que en neuronas GnRHérgicas GT1, concentraciones fisiológicas de 17β -estradiol (10 nM) en un período de 48 h, reducen la acumulación de AMPc inducida por NE, pero no la inducida por la activación directa de las adenilato ciclasas. Estos resultados indican que las neuronas GnRHérgicas GT1 son moduladas directamente por estrógenos, causando éstos una desensibilización de los adrenoreceptores (Martínez-Morales, et al., 2001). Este dato sugiere que el tratamiento estrogénico podría tener un efecto final inhibitorio sobre la secreción de la GnRH. Sin embargo, falta considerar la posibilidad de que este efecto final sea modificado en función del tiempo. La desensibilización de los receptores β -adrenérgicos se ha visto por efecto de tratamientos estrogénicos de 48 h, pero no de 24 h (Ungar, et al, 1993). En el presente estudio se observa un incremento en el nivel de RNA mensajero correspondiente al receptor β 1-adrenérgico a las 6 h de tratamiento. Por lo tanto, muy probablemente existe un efecto estrogénico final estimulador sobre la secreción de la GnRH en respuesta a la estimulación adrenérgica alrededor de un periodo de 6 h del tratamiento estrogénico, debido a un incremento en la cantidad de receptores β 1-adrenérgicos, y que posteriormente este efecto sea opuesto debido a que estos sean desacoplados de sus vías de transducción. Esta hipótesis podría ser estudiada realizando mediciones de la secreción de la GnRH en cultivos de neuronas GT1-7 tratadas con 17β -estradiol y estimuladas con NE ó agonistas adrenérgicos selectivos, y así analizar los niveles de GnRH en función del tiempo de tratamiento estrogénico.

Para integrar la información que se tiene al momento, en cuanto a la regulación estrogénica de la señal adrenérgica que regula el eje reproductivo, habría que considerar tanto al efecto estrogénico directo como al ya estudiado efecto indirecto. De esta forma tenemos un mecanismo de retroalimentación positiva sobre la secreción de la GnRH en un período de tiempo relativamente corto (6 h), causado por un incremento en la respuesta de las neuronas GnRHérgicas a la señal adrenérgica

debido a un incremento en la densidad de receptores adrenérgicos por efecto directo del estradiol. Posteriormente este efecto estrogénico torna de ser del tipo positivo a ser del tipo negativo, lo cual puede ser debido a una inhibición de la secreción de noradrenalina por efecto indirecto del estradiol, es decir, actuando éste sobre las neuronas adrenérgicas aferentes a las neuronas GnRHérgicas, además de un efecto estrogénico directo que causa un desacoplamiento de los receptores adrenérgicos, lo que conlleva a una disminución en la respuesta de las neuronas GnRHérgicas a la señal adrenérgica. Para comprobar esta hipótesis habría que estudiar el efecto de tratamientos estrogénicos en función del tiempo, sobre la estimulación adrenérgica de la GnRH en explantes hipotalámicos.

Respecto a la participación de la dopamina (DA) en el eje reproductivo, múltiples estudios han demostrado que esta catecolamina participa en el control de la secreción de gonadotropinas. Sin embargo, no se ha determinado su efecto preciso sobre este sistema, ya que existen numerosos estudios con resultados inconsistentes. Según el modelo de estudio y su condición fisiológica se observa estimulación, inhibición o ausencia de efecto sobre la secreción de la LH o GnRH (ver Kordon, et al., 1994). Se ha demostrado que la administración intraventricular de DA tiene un efecto inhibitorio de la frecuencia pulsátil de la LH (Drouva y Gallo, 1976; Gnodde y Schuling, 1976; Gallo y Drouva, 1979; Gallo, 1984). Por otra parte, se ha reportado que la administración directa de DA sobre explantes hipotalámicos estimula la liberación de la GnRH (Nowak, 1985; Negro-Vilar, et al., 1979; Rotsztejn, et al., 1977). Los estudios realizados *in vivo* o con explantes de tejido, no coinciden con los estudios realizados con líneas celulares inmortalizadas. En células GT1, se conoce que la modulación de la liberación de la GnRH por esta catecolamina al igual que en el caso de la NE, es estimuladora y de manera dosis-dependiente y actúa a través del receptor D1-dopaminérgico acoplado positivamente a adenilato ciclasas (Martínez de la Escalera, et al., 1992c; Findell et al., 1993). Cabe la posibilidad de que la respuesta a la señal dopaminérgica por parte de las neuronas GnRHérgicas sea modificada por factores moduladores del eje reproductivo, los cuales comúnmente varían durante el desarrollo de los individuos. De esta forma, se explicaría la controversia que existe en cuanto al efecto de la dopamina sobre la regulación de la secreción de gonadotropinas. Se ha propuesto que los estrógenos afectan a nivel central el sistema dopaminérgico, ya que se ha observado un fuerte impacto de estas hormonas sobre el estado mental y el comportamiento (Fink et al., 1996). Existen evidencias en diversos modelos animales de que los estrógenos producen cambios funcionales en el metabolismo dopaminérgico y en los niveles de sus respectivos receptores (Di Paolo, et al., 1982; Tandom, et al., 1985). Entre los

efectos estrogénicos indirectos de regulación de la GnRH, se encuentra la modulación de las aferencias dopaminérgicas, en las cuales se ha detectado el RE α . Además, se ha observado que el número de contactos entre fibras de neuronas dopaminérgicas y neuronas GnRHérgicas es variable en función del ciclo estral (Mitchell, et al., 2003). Esto muestra que la regulación de las neuronas GnRHérgicas por DA es influenciada por estrógenos.

En este estudio encontramos un efecto estrogénico directo, que consiste en un incremento en la expresión de receptores dopaminérgicos en células GT1. La modulación estrogénica de este gen se ha observado en otros sistemas. Al estudiar el control de la transcripción del gen correspondiente al receptor D1A dopaminérgico humano, mediante estimulación estrogénica en una línea celular que expresa este gen como es el neuroblastoma SK-N-MC, en la región promotora se localizó un segmento que responde a estrógenos. También se observó que esta región contiene la secuencia consenso del elemento de respuesta a estrógenos (ERE) (Lee y Mouradian, 1999). De ser proporcional el incremento en el nivel de RNA mensajero de este receptor dopaminérgico con un incremento en la síntesis de esta proteína en las neuronas GnRHérgicas, este efecto estrogénico se podría traducir en un aumento en la respuesta de estas células a la señal dopaminérgica, lo cual induciría un aumento en la secreción de la GnRH. En base a esto, el efecto estrogénico consistiría en un mecanismo que involucraría una señal de retroalimentación positiva. Esta señal se sumaría al efecto estrogénico indirecto ya estudiado sobre la aferencia dopaminérgica, el cual consiste en un incremento en el número de contactos sinápticos de estas aferencias con las neuronas GnRHérgicas (Mitchel, et al., 2003).

En cuanto al posible mecanismo mediante el cual el efecto estrogénico observado se presente a las 6 y no a las 24 y 48 h, se podría atribuir a una disminución de los RE por efecto del tratamiento estrogénico. Este efecto estrogénico se ha reportado recientemente. En un estudio *in vivo*, se encontró que en el área hipotalámica preóptica medial y en el hipotálamo medial de ratas ovariectomizadas, se redujo significativamente el nivel de expresión génica de los RE α y RE β por efecto de un tratamiento estrogénico de tres días (Gao, et al., 2003). En otra investigación anterior, se observó que la detección inmunohistoquímica del RE β en neuronas GnRHérgicas de explantes hipotalámicos de ratas ovariectomizadas, disminuye por efecto de un tratamiento estrogénico (Kallo, et al., 2001). Considerando estos hallazgos, se podría atribuir la ausencia del efecto estrogénico durante los períodos más prolongados como lo fue a las 24 y 48 h, a una posible disminución de RE por efecto del

tratamiento estrogénico. Este efecto estrogénico que implica una disminución en la expresión de los RE (que conlleva a una ausencia de los efectos estrogénicos iniciales), muy probablemente sea de corta duración, ya que ante una disminución de los RE, el 17β -estradiol ya no podría continuar ejerciendo sus efectos genómicos, incluyendo la represión de los genes de los RE. De esta manera, se recuperaría la expresión basal de RE, y se podrían presentar nuevamente los efectos estrogénicos genómicos. Es decir, habría un sistema de retroalimentación de la expresión génica de los RE regulado por su mismo ligando.

De ser cierta esta hipótesis, los efectos directos del estradiol mediante mecanismos de acción genómicos sobre las neuronas GnRHérgicas, se efectuarían de manera cíclica. Este mecanismo podría ser el responsable del resultado obtenido relativo al receptor β 1-adrenérgico. De acuerdo al análisis estadístico, el incremento en la expresión de este receptor a las 6 y 48 h de tratamiento estrogénico de mayor dosis es significativo, lo cual no ocurrió a las 24 h. Sin embargo, hasta no cuantificar la expresión génica y/o la proteína correspondiente a los RE en neuronas GnRHérgicas tratadas con 17β -estradiol por un rango de tiempo amplio, no es posible confirmar este mecanismo propuesto.

En resumen, al integrar los datos obtenidos en este estudio, en cuanto el efecto observado sobre la expresión de receptores adrenérgicos y dopaminérgicos, se observa que coincide en función del tiempo. En ambos casos el efecto máximo sobre la expresión génica se observa a las 6 h del tratamiento estrogénico. De esta manera, los estrógenos muestran una participación en el eje reproductivo actuando de manera directa sobre neuronas GnRHérgicas mediante un mecanismo de acción genómico, modulando en una misma célula dos genes blancos que conllevaran a un mismo resultado, el incremento en la secreción de la GnRH.

9. CONCLUSIÓN

El estradiol participa en el circuito de retroalimentación del eje reproductivo actuando directamente sobre las neuronas secretoras de la GnRH. Esta hormona esteroide induce un incremento en la expresión de receptores β 1-adrenérgicos y D1-dopaminérgicos en las neuronas GnRHérgicas GT1-7.

Este efecto podría involucrar un aumento en el flujo de información por las aferencias adrenérgicas y dopaminérgicas que regulan al eje reproductivo, debido a un aumento en la respuesta de las neuronas GnRHérgicas a estas señales. Este mecanismo podría formar parte de la regulación estrogénica del eje reproductivo del tipo de la retroalimentación positiva.

10. REFERENCIAS

- Alonso-Solis R, Abreu P, Lopez-Coviella I, Hernandez G, Fajardo N, Hernandez-Diaz F, Diaz-Cruz A, Hernandez A. 1996. Gonadal steroid modulation of neuroendocrine transduction: a transynaptic view. *Cell Mol Neurobiol.* 16, 357-382.
- Amoss M, Burgus R, y Blakwell R. 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of bovine origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 205-210.
- Anderson GM, Connors JM, Hardy SL, Valent M, Goodman RL. 2001. Oestradiol microimplants in the ventromedial preoptic area inhibit secretion of luteinizing hormone via dopamine neurones in anoestrous ewes. *J Neuroendocrinol.* 13, 1051-1058.
- Ansonoff MA, Etgen AM. 2000. Evidence that oestradiol attenuates beta-adrenoceptor function in the hypothalamus of female rats by altering receptor phosphorylation and sequestration. *J Neuroendocrinol.* 12, 1060-1066.
- Bernard PS, Wittwer CT. 2002. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem.* 48, 1178-1185.
- Buchanan CD, Mahesh VB, Brann DW. 2000. Estrogen-astrocyte-luteinizing hormone-releasing hormone signaling: a role for transforming growth factor-beta(1). *Biol Reprod.* 62, 1710-1721.
- Caraty A, Locatelli A, Martin GB. 1989. Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol. *J Endocrinol.* 123, 375-382.
- Cavarretta I, Magnaghi V, Ferraboschi P, Martini L, Melcangi RC. 1999. Interactions between type 1 astrocytes and LHRH-secreting neurons (GT1-1 cells): modification of steroid metabolism and possible role of TGFbeta1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 71, 41-7.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-159.
- Chongthammakun S, Terasawa E. 1993. Negative feedback effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone release occur in pubertal, but not prepubertal, ovariectomized female rhesus monkeys. *Endocrinol.* 132, 735-743.
- Conn PM. 1994. The Molecular Mechanism of Gonadotropin-Releasing Hormone Action in the Pituitary. En: Knobil E y Neil JD (Eds), *The Physiology of Reproduction.* (pp. 1815-1816). New York: Raven Press.
- Di Paolo T, Poyet P, Labrie F. 1982. Prolactin and estradiol increase striatal dopamine receptor density in intact, castrated and hypophysectomized rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 6, 377-82.

Drouva SV, Gallo RV. 1976. Catecholamine involvement in episodic luteinizing hormone release in adult ovariectomized rats. *Endocrinol.* 99, 651-658.

Domínguez R. 1993. Las Secreciones Periódicas y la Regulación de la Ovulación. En: *Comunicación Neuroendocrina, Bases Celulares y Moleculares.* (pp. 251-254.) México: Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas..

Doughty C, Booth JE, McDonald PG, Parrott RF. 1975a. Inhibition, by the anti-oestrogen MER-25, of defeminization induced by the synthetic oestrogen RU 2858. *J Endocrinol.* 67, 459-460.

Doughty C, Booth JE, McDonald PG, Parrott RF. 1975b. Effects of oestradiol-17beta, oestradiol benzoate and the synthetic oestrogen RU 2858 on sexual differentiation in the neonatal female rat. *J Endocrinol.* 67, 419-424.

Engstrom T, Vilhardt H, Bratholm P, Christensen NJ. 2001. Desensitization of beta2-adrenoceptor function in non-pregnant rat myometrium is modulated by sex steroids. *J Endocrinol.* 170, 147-155.

Etgen AM, Petitti N. 1987. Mediation of norepinephrine-stimulated cyclic AMP accumulation by adrenergic receptors in hypothalamic and preoptic area slices: effects of estradiol. *J Neurochem.* 49, 1732-1739.

Etgen AM, Ansonoff MA, Quesada A. 2001. Mechanisms of ovarian steroid regulation of norepinephrine receptor-mediated signal transduction in the hypothalamus: implications for female reproductive physiology. *Horm Behav.* 40, 169-177.

Evans NP, Dahl GE, Mauger D, Karsch FJ. 1995. Estradiol induces both qualitative and quantitative changes in the pattern of gonadotropin-releasing hormone secretion during the presurge period in the ewe. *Endocrinol.* 136, 1603-1609.

Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev.* 52, 513-556.

Findell PR, Wong KH, Jackman JK, y Daniels DV. 1993. β 1- Adrenergic and dopamine (D1)-receptors coupled to adenylyl cyclase activation in GT1 gonadotropin-releasing hormone neurosecretory cells. *Endocrinol.* 132, 682-688.

Fink G, Sumner BE, Rosie R, Grace O, Quinn JP. 1996. Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. *Cell Mol Neurobiol.* 16, 325-344.

Fox SR, Harlan RE, Shivers BD, Pfaff DW. 1990. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinol.* 51, 276-283.

Gallo RV, y Drouva SV. 1979. Effect of intraventricular infusión of catecholamines on luteinizing hormone release in ovariectomized, steroid primed rats. *Neuroendocrinol.* 29, 149-162.

Gallo RV. 1984. Further studies on norepinephrine-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinol.* 39, 120-5.

Gao G, Herbert Z, Kong J, Gabrielson N, Mautz A, Wu D, Jirikowski GF, Caldwell JD. 2003. Estradiol control of expression and levels of estradiol-binding proteins in the medial preoptic area, medial hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinol.* 78, 61-71.

Gnodde HP, Schuiling GA. 1976. Involvement of catecholaminergic and cholinergic mechanisms in the pulsatile release of LH in the long-term ovariectomized rat. *Neuroendocrinol.* 20, 212-23.

Gómez-Palacino JA y Barón-Castañeda G. 2002.

<http://www.encolombia.com/fundamentos-endocrino-gine-capitulo2>.

Gore AC y Roberts JL. 1997. Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in vivo and in vitro. *Front. Neuroendocrinol.* 18, 209-245.

Guimaraes S, Moura D. 2001. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev.* 53, 319-56. Erratum in: *Pharmacol Rev* 2001 Sep;53(3):451.

Haisenleder DJ, Dalkin AC y Marshall JC. 1994. Regulation of gonadotropin gene expression. En: Knobil E y Neil JD (Eds), *The Physiology of Reproduction*. (pp. 1739). New York : Raven Press.

Hatjis CG, Koritnik DR y Crews A. 1988. Up-regulation of guinea pig myometrial beta-adrenoreceptors by systemic estradiol and progesterone. *Endocrinol.* 122, 1455-9.

Herbison AE, y Theodosis DT. 1992. Localisation of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience.* 50, 283-298.

Herbison AE. 1998. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr. Rev.* 19, 302-330.

Herbison AE, Pape JR. 2001. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol.* 22, 292-308.

Herbison AE, Skynner MJ, Sim JA. 2001. Lack of detection of estrogen receptor- α transcripts in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinol.* 42, 493.

Hrabovszky E, steinhauser A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z. 2001. Estrogen receptor- β immunoreactive in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinol.* 142, 3261-3264.

Huang X y Harlan RE. 1993. Absence of androgen receptors in LHRH immunoreactive neurons. *Brain Res.* 624, 309-311.

Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kallo M, Goubillon ML y Coen CW. 2001. Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol.* 13, 741-748.

- Kalra SP, y Kalra PS. 1989. Do testosterone and estradiol-17 β enforce inhibition or stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion?. *Biol. Reprod.* 41, 559-570.
- Karkanias GB, Ansonoff MA, Etgen AM. 1996. Estradiol regulation of alpha 1b-adrenoceptor mRNA in female rat hypothalamus-preoptic area. *J Neuroendocrinol.* 8, 449-455.
- Karkanias GB, Li CS, Etgen AM. 1997. Estradiol reduction of alpha 2-adrenoceptor binding in female rat cortex is correlated with decreases in alpha 2A/D-adrenoceptor messenger RNA. *Neuroscience.* 81, 593-597
- Kordon C, Drouva SV, Martínez de la Escalera G y Weiner RI. 1994. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactine. En: Knobil E y Neil JD, (Eds), *The Physiology of Reproduction.* (pp. 1623-1629). New York: Raven Press.
- Krajewski SJ, Abel TW, Voytko ML, Rance NE. 2003. Ovarian steroids differentially modulate the gene expression of gonadotropin-releasing hormone neuronal subtypes in the ovariectomized cynomolgus monkey. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 655-662.
- Kreda SM, Sumner M, Fillo S, Ribeiro CM, Luo GX, Xie W, Daniel KW, Shears S, Collins S, Wetsel WC. 2001. Alpha(1)-adrenergic receptors mediate LH-releasing hormone secretion through phospholipases C and A(2) in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinol.* 142, 4839-4851.
- Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Balla T, al-Damluji S, Weiner RI, Catt KJ. 1991. Receptors and neurosecretory actions of endothelin in hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15,11124-11128.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996 Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11,5925-5930.
- Lee A, Talley E, Rosin DL, Lynch KR. 1995. Characterization of alpha 2A-adrenergic receptors in GT1 neurosecretory cells. *Neuroendocrinol.* 62, 215-225.
- Lee SH y Mouradian MM. 1999. Up-regulation of D1A receptor gene transcription by estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 156, 151-157.
- Lee EJ, Moore CT, Hosny S, Centers A, Jennes L. 2000. Expression of estrogen receptor-alpha and c-Fos in adrenergic neurons of the female rat during the steroid-induced LH surge. *Brain Res.* 1, 56-65.
- Legan SJ, Callahan WH. 1999. Suppression of tonic luteinizing hormone secretion and norepinephrine release near the GnRH neurons by estradiol in ovariectomized rats. *Neuroendocrinol.* 70, 237-245.
- Lehman MN, y Karsch FJ. 1993. Do gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinol.* 133, 887-895.

Lopez FJ, Merchenthaler I, Ching M, Wisniewski MG, Negro-Vilar A. 1991. Galanin: a hypothalamic-hypophysiotropic hormone modulating reproductive functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15,4508-4512.

Malik KF, Silverman, AJ y Morrell JI. 1991. Gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat: distribution and neuronal content over the estrous cycle and after castration of males. *Anat. Rec.* 231, 457-466.

Marchetti B, Labrie F. 1990. Hormonal regulation of beta-adrenergic receptors in the rat mammary gland during the estrous cycle and lactation: role of sex steroids and prolactin. *Endocrinol.* 126, 575-81.

Marks DL, Lent KL, Rossmannith WG, Clifton DK y Steiner RA. 1994. Activation-dependent regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons in the female rat. *Endocrinol.* 134, 1991-1998.

Martínez de la Escalera G, Choi ALH y Weiner RI. 1992a. Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: Intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1852-1855.

Martínez de la Escalera G, Choi ALH y Weiner RI. 1992b. β 1-Adrenergic regulation of the GT1 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: Stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinol.* 131, 1397-1402.

Martinez de la Escalera G, Gallo F, Choi AL, Weiner RI. 1992c. 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, 2965-71.

Martinez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI. 1994. Biphasic gabaergic regulation of GnRH secretion in GT1 cell lines. *Neuroendocrinol.* 59, 420-425.

Martínez de la Escalera G y Clapp C. 2001. Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion: Insights from GT1 immortal GnRH neurons. *Archives of Medical Research.* 32, 486-498.

Martínez –Morales JR, Morales A, Marín R, Hernández-Jimenez JG, Acevedo A, Guerra B, Hernández G, López-Coviella I, Prieto L y Alonso R. 2001. Estrogen modulates norepinephrine-induced accumulation of adenosine cyclic monophosphate in a subpopulation of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone secreting neurons from the mouse hypothalamus. *Neuroscience Letters.* 298, 61-64.

Melcangi RC, Martini L, y Galbiati M. 2002. Growth factors and steroid hormones: a complex interplay in the hypothalamic control of reproductive functions. *Elsevier Science Ltd.* 67, 421-449.

Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula ChA, Roberts JL y Weiner RI. 1990. Inmortalization of hypothalamic GnRH Neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron.* 5, 1-10.

- Mitchell V, Loyens A, Spergel DJ, Flactif M, Poulain P, Tramu G, y Beauvillain JC. 2003. A confocal microscopic study of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron inputs to dopaminergic neurons containing estrogen receptor alpha in the arcuate nucleus of GnRH-green fluorescent protein transgenic mice. *JC. Neuroendocrinol.* 77, 198-207.
- Moenter SM, DeFazio AR, Pitts GR, Nunemaker CS. 2003. Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.* 24, 79-93.
- Mortimer CH, Besser GM y McNeilly AS. 1975. En: Motta M, Crosignani PG y Martini L. *Hypothalamic hormones* (pp. 325-336). Londres : Academic Press.
- Monjo M, Rodriguez AM, Palou A, Roca P. 2003. Direct effects of testosterone, 17 beta-estradiol, and progesterone on adrenergic regulation in cultured brown adipocytes: potential mechanism for gender-dependent thermogenesis. *Endocrinol.* 144, 4923-30.
- Moss RL, Dudley CA, Foreman MM y McCann SM. 1975. En: Motta M, Crosignani PG y Martini L. *Hypothalamic hormones* (pp. 269-278). Londres : Academic Press.
- Negro-Vilar A, Ojeda SR, y McCann SM. 1979. Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals in vitro. *Endocrinol.* 104, 1749-57.
- Nimmo AJ, Whitaker EM, Carstairs JR, Morrison JF. 1989. The presence of beta-adrenoceptors in rat endometrium is dependent on circulating oestrogen. *J Endocrinol.* 122, R1-4.
- Nowak FV y Swerdloff RS. 1985. Gonadotropin-releasing hormone release by superfused hypothalami in response to norepinephrine. *Biol Reprod.* 33, 790-6.
- Pasqualini C, Bojda F, Kerdelhue B. 1986. Direct effect of estradiol on the number of dopamine receptors in the anterior pituitary of ovariectomized rats. *Endocrinology.* 119, 2484-2489.
- Pau KY, Hess DL, Kohama S, Bao J, Pau CY, Spies HG. 2000. Oestrogen upregulates noradrenaline release in the mediobasal hypothalamus and tyrosine hydroxylase gene expression in the brainstem of ovariectomized rhesus macaques. *J Neuroendocrinol.* 12, 899-909.
- Petitti N, Etgen AM. 1990. Alpha 1-adrenoceptor augmentation of beta-stimulated cAMP formation is enhanced by estrogen and reduced by progesterone in rat hypothalamic slices. *J Neurosci.* 10, 2842-2849
- Petitti N, Karkanias GB, Etgen AM. 1992. Estradiol selectively regulates alpha 1B-noradrenergic receptors in the hypothalamus and preoptic area. *J Neurosci.* 12, 3869-76.
- Pfaff DW. 1973. Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. *Science.* 14, 1148-1149.
- Poletti A, Melcangi RC, Negri-Cesi P, Maggi R, Martini L. 1994. Steroid binding and metabolism in the luteinizing hormone-releasing hormone-producing neuronal cell line GT1-1. *Endocrinol.* 135, 2623-8.

Radovick S, Ticknor CM, Nakayama Y, Notides AC, Rahman A, Weitraub BD, Cutler Jr GB, y Wondisford FE. 1991. Evidence for direct estrogen regulation of the human gonadotropin-releasing hormone gene. *J Clin Invest.* 88, 1649-1655.

Radovick S, Wray S, Muglia L, Westphal H, Olsen B, Smith E, Patriquin E, Wondisford FE. 1994. Steroid hormone regulation and tissue-specific expression of the human GnRH gene in cell culture and transgenic animals. *Horm Behav.* 28, 520-9.

Rage F, Lee BJ, Ma YJ, Ojeda SR. 1997. Estradiol enhances prostaglandin E2 receptor gene expression in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and facilitates the LHRH response to PGE2 by activating a glia-to-neuron signaling pathway. *J Neurosci.* . 17, 9145-9156.

Rawson JA, Scott CJ, Pereira A, Jakubowska A, Clarke IJ. 2001. Noradrenergic projections from the A1 field to the preoptic area in the brain of the ewe and Fos responses to oestrogen in the A1 cells. *J Neuroendocrinol.* 13, 129-138.

Richardson DW, Gordon K, Billiar RB, Little AB. 1992. Chronic hyperestrogenemia: lack of positive feedback action on gonadotropin-releasing hormone-induced luteinizing hormone release and dual site of negative feedback action. *Endocrinol.* 130, 1090-1096.

Rhoades RA, Tanner GA. 1997. *Fisiología Médica.* (pp. 760-761). Barcelona: MASSON-Little, Brown, S.A.

Rotsztein WH, Charli JL, Pattou E, Kordon C. 1977. Stimulation by dopamine of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) release from the mediobasal hypothalamus in male rats. *Endocrinol.* 101, 1475-1483.

Roy D, Angelini NL y Belsham DD. 1999. Estrogen directly represses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor- α (ER α)- and ER β -expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinol.* 140, 5045-5053.

Sawyer CH, Markee JE, Hollinshead WH. 1947. Inhibition of ovulation in rabbit by the adrenergic-blocking agent dibenamine. *Endocrinol.* 41, 395-402.

Sawyer CH, Markee JE, Everett JW. 1950. Further experiments on blocking pituitary activation in the rabbit and in the rat. *J. Exp. Zool.* 113, 659-666.

Sawyer CH. 1952. Stimulation of ovulation in the rabbit by the intraventricular injection of epinephrine or norepinephrine. *Anat. Rec.* 112, 385-391.

Schally AV, Arimura A, Baba Y. 1971. Isolation and properties of the FSH- and LH-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 393-399.

Shen ES, Meade EH, Pérez MC, Decher DC, Negro-Vilar A, López FJ. 1998. Expression of functional estrogen receptors and galanin messenger ribonucleic acid in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons: Estrogenic control of galanin gene expression. *Endocrinol.* 139, 939-948.

- Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW. 1983. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature*. 304-345.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. 1994. *Basic Neurochemistry*. (pp 270-270) New York: Raven Press.
- Silverman AJ, Jhamandas J, Renaud LP. 1987. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J Neurosci*. 7, 2312-2319.
- Skynner MJ, Sim JA, Herbison AE. 1999. Detection of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinol*. 140, 5195-201.
- Splett CL, Scheffen JR, Desotelle JA, Plamann V, Bauer-Dantoin AC. 2003. Galanin enhancement of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone secretion in female rats is estrogen dependent. *Endocrinol*. 144, 484-90.
- Strand FL. 1999. *Neuropeptides: Regulators of Physiological Processes*. (pp. 99-101). London: MIT Press.
- Tandon P, Agkawal AK, Barthwal JP, Gupta ML, Seth PK. 1985. Estrogen induced alterations in the sensitivity of dopamine receptors in rat. *Indian J Pharmac*. 17, 132-135.
- Terasawa E, Krook C, Hei DL, Gearing M, Schultz NJ, Davis GA. 1988. Norepinephrine is a possible neurotransmitter stimulating pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone in the rhesus monkey. *Endocrinol*. 123, 1808-16.
- Tortora G y Anagnostakos N. 1993. *Principios de Anatomía y Fisiología*. . (pp. 604-608, 617, 656). México: Oxford University Press México, S.A. de C.V.
- Tresguerres JAF, Aguilar-Benítez E, Cachofeiro MV, Cardinali D, Gil-Loyzaga P, Lahera-Juliá V, Martínez-Verano J, Mora-Teruel F, Rodríguez-Roisin R, Romano-Pardo M, Tamargo-Menéndez J y Zarco-Gutiérrez P. 1999. *Fisiología Humana*. (pp. 815,817,818 y 849).España: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.
- Uemura T, Nishimura J, Yamaguchi H, Hiruma H, Kimura F, Minaguchi H. 1997. Effects of noradrenaline on GnRH-secreting immortalized hypothalamic (GT1-7) neurons. *Endocr J*. 44, 73-78.
- Ungar S, Makman MH, Morris SA, Etgen AM. 1993. Estrogen uncouples beta-adrenergic receptor from the stimulatory guanine nucleotide-binding protein in female rat hypothalamus. *Endocrinol*. 133, 2818-2826.
- Verdi JM, Campagnoni AT. 1990. Translational regulation by steroids. Identification of a steroid modulatory element in the 5'-untranslated region of the myelin basic protein messenger RNA. *J Biol Chem*. 25, 20314-20320.

Vreeburg JTM, van der Vaart PDM, van der Schoot P. 1977. Prevention of central defeminization but not masculinization in male rats by inhibition neonatally of oestrogen biosynthesis. *J. Endocrinol.* 74, 375-382.

Weiner RI, Wetsel W, Goldsmith P, Martinez de la Escalera G, Windle J, Padula C, Choi A, Negro-Vilar A, Mellon P. 1992. Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Front Neuroendocrinol.* 13, 95-119.

Witkin JW, Ferin M, Popilskis SJ, Silverman AJ. 1991. Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinol.* 129, 1083-92.

Yang RC, Shih HC, Hsu HK, Chang HC, Hsu C. 2003. Estradiol enhances the neurotoxicity of glutamate in GT1-7 cells through an estrogen receptor-dependent mechanism. *Neurotoxicol.* 24, 65-73.

Zsarnovszky A, Horvath TL, Garcia-Segura LM, Horvath B, Naftolin F. 2001. Oestrogen-induced changes in the synaptology of the monkey (*Cercopithecus aethiops*) arcuate nucleus during gonadotropin feedback. *J Neuroendocrinol.* 13, 22-28.

Zárate-Treviño A, Morán-Villota CE, Feria-Velasco A, Kubli-Garfias C. 1993. *Fundamentos de Neuroendocrinología.* (pp. 16, 96, 100). México: Fondo de Cultura Económica, S.A. de C.V.

11. ANEXOS

11.1 ABREVIATURAS

| | |
|--------------|-------------------------------------------|
| AMPC | Monofosfato de Adenosina cíclico * |
| cDNA | Acido desoxirribonucléico complementario* |
| DA | Dopamina |
| DNA | Acido desoxirribonucléico* |
| ERE | Elemento de respuesta a estrógenos |
| FSH | Hormona folículo estimulante* |
| GnRH | Hormona liberadora de gonadotropinas* |
| HHG | Hipotálamo hipófisiario gonadal |
| LH | Hormona luteinizante* |
| NE | Norepinefrina |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa* |
| pb | Pares de bases |
| PLC | Fosfolipasa C * |
| qPCR | PCR cuantitativo* |
| RE α | Receptor a estrógenos alfa |
| RE β | Receptor a estrógenos beta |
| β 1-AR | Receptor β 1-adrenérgico* |
| D1-DR | Receptor D1-dopaminérgico* |
| RT | Retrotranscripción |
| RNA | Acido ribonucléico* |

* Por sus siglas en ingles.