

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**



T E S I S:

***MODULACIÓN ESTROGÉNICA DEL EJE REPRODUCTIVO POR
ACCIÓN DIRECTA SOBRE LAS NEURONAS GnRHÉRGICAS:***

***REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES
ADRENÉRGICOS, ESTROGÉNICOS Y DEL SISTEMA
KISSPEPTINA/GPR54 POR 17 β -ESTRADIOL EN CÉLULAS GT1-7***

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
PRESENTA:**

M. C. JESSICA SARAI DH JACOBI ELIZONDO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA

JURIQUILLA, QRO. A JUNIO DEL 2008.



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 tutoría en el desarrollo de la presente tesis, en mi formación académica, y por la oportunidad que siempre me brindó para integrar nuevas preguntas en el presente proyecto.

Muy especialmente a Gabriel Nava por su experta y paciente instrucción en todas las técnicas de biología molecular utilizadas en el presente trabajo, como también por su amistad y apoyo en todo lo relativo a mi estancia en Qro.

A Mike Jeziorski por sus asesorías, recomendaciones y especialmente por su apoyo en la publicación final.

A los Drs. Enrique Pedernera Astegiano y Raúl Paredes Guerrero por su asesoría como comité tutorial durante el transcurso del doctorado, y muy especialmente por permitirme participar en colaboraciones con sus laboratorios.

A los revisores del presente escrito por sus valiosas contribuciones, los Drs. Carlos Valverde Rodríguez, Marco Antonio Cerbón Cervantes, Ignacio Camacho Arroyo, María Sitges Berrondo y Maria Teresa Morales Guzmán.

A mis compañeros Cecilia Martín y Gerardo Peréra por su apoyo en múltiples experimentos y por su muy grata compañía.

A Claudia Vega y Miriam Zamorano, por su asesoría en el manejo de técnicas para experimentos *in vivo* (inmunohistoquímica, implante de cánulas, etc.) realizadas posteriormente al trabajo aquí presente.

A Fernando López por su apoyo en el uso de software para la elaboración de imágenes.

A todo el excelente equipo de trabajo del laboratorio A-15 y A-14 en donde realicé el presente trabajo, a la Dra. Carmen Clapp, Maricarmen, Stephani, Jessica G, Carlitos, Celina, Mayda, Ivonne, Mary y Norma, quienes siempre me apoyaron, particularmente en la preparación de presentaciones para exámenes. Y muy especialmente a los técnicos laboratoristas Antonio Prado y Daniel Mondragón, quienes de manera muy entusiasta me brindaron su apoyo en gran parte del presente trabajo experimental, además de su muy grata amistad.

A los Drs. Gina Quirarte y Roberto Prado por su colaboración con el instrumental de su laboratorio para los experimentos posteriores al trabajo aquí presente, y muy especialmente por su amistad y apoyo en todo lo relativo a mi estancia en Qro.

A Patricia García Horsman por su interés y entusiasta participación con experimentos conductuales implicados en la línea de investigación del presente proyecto.

A mis compañeros recientemente integrados al laboratorio, Cristina Hernández (Chikis) y Lenin Tamay por su entusiasta colaboración en los nuevos experimentos.

A Anaid Antaramian por su apoyo con las secuenciaciones de ADN, por haberme dado la oportunidad de participar en los cursos de la Unidad de Proteogenómica y por su grata amistad.

A Adriana González por su colaboración con las secuenciaciones de ADN en la Unidad de Proteogenómica del INB.

Muy especialmente a Verónica Morales por su generoso apoyo en la preparación de mi presentación para el examen de Candidatura.

A Teresa Peña por darme la oportunidad de participar como maestra en los cursos de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ.

A Dorothy Pless, por su indispensable ayuda con el idioma inglés, además de su amistad y muy gratos momentos con el grupo que ella formó, integrado inicialmente por Maricela Luna, Flor Herrera, Maria Luisa Chong y Maricarmen González, a quienes también agradezco todo su apoyo y buenos consejos.

A Pilar Galarza por su apoyo con los servicios de la biblioteca y por su amistad.

A Martín García Servin, su colaboración y recomendaciones para los experimentos realizados en animales posteriormente al trabajo aquí presente.

A Lourdes Lara por su colaboración en todas las videoconferencias requeridas durante el transcurso del doctorado.

A todo el personal del Departamento de Posgrado del Instituto de Neurobiología, por su muy eficiente trabajo. Muy especialmente a Leonor Cassanova y a Carmen Vázquez.

Al personal de la Unidad de Posgrado del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Zenaida Martínez, Angélica Téllez y Lorena Olivares por su apoyo en los trámites de la estancia de investigación y de titulación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada durante todo el período del doctorado.

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.

Y muy especialmente a mi esposo Arnulfo por su apoyo incondicional en todo lo relativo a este trabajo, incluyendo su colaboración en experimentos.

CONTENIDO:

1. RESUMEN

2. ABSTRACT

3. INTRODUCCIÓN

4. ANTECEDENTES

4.1 EJE REPRODUCTIVO

4.2 NEURONAS GnRHÉRGICAS INMORTALIZADAS: CÉLULAS GT1

4.3 MODULADORES DE LA SECRECIÓN DE LA GnRH

4.3.1 ESTRÓGENOS

4.3.2 NOREPINEFRINA

4.3.3 KISSPEPTINAS

5. HIPÓTESIS

6. OBJETIVOS

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS

7.2 EXTRACCIÓN DE ARN, TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

7.3 PCR EN TIEMPO REAL

7.4 MEDICIÓN DE GnRH

7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

8. RESULTADOS

9. DISCUSIÓN

10. CONCLUSIONES

11. LITERATURA CONSULTADA

12. ANEXO (PUBLICACIÓN)

1. RESUMEN

Existen múltiples mecanismos estrogénicos de regulación del eje reproductivo. Entre los más estudiados se encuentran la regulación estrogénica a nivel de la hipófisis y la regulación estrogénica indirecta de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas ó GnRH (por sus siglas en ingles), la cual ocurre por acción de los estrógenos sobre células aferentes a las neuronas secretoras de la GnRH, células que conforman la vía final común de este eje. En el presente estudio se analizó un mecanismo de acción directa del estradiol sobre neuronas GnRHérgicas. Se propuso como hipótesis que los esteroides gonadales actúan modificando la expresión de proteínas involucradas en la regulación de la secreción de la GnRH, incluyendo a los receptores a moduladores que participan en la comunicación endócrina y sináptica aferente. Para analizar esta hipótesis se determinó en neuronas GnRHérgicas inmortalizadas GT1-7 el efecto del 17β -estradiol sobre la expresión de receptores a dos importantes señales reguladoras de la GnRH, como lo son la norepinefrina y la kisspeptina (un muy potente estimulador de la secreción de la GnRH recientemente descubierto). Primeramente se encontró que los nueve receptores adrenérgicos (RA) conocidos son expresados en las células GT1-7. De forma paralela se encontró la expresión funcional del receptor a la kisspeptina, conocido como GPR54. También se detectó en esta línea celular al ARN mensajero correspondiente a KiSS-1, lo cual sugiere la posibilidad de un mecanismo de señalización autócrina por parte de este péptido recientemente implicado en el eje reproductivo. Posteriormente se analizó mediante RT-PCR en tiempo real el efecto del tratamiento con 17β -estradiol (10 nM) por períodos de 3, 6, 12, ó 24 horas, sobre el nivel de expresión de estas moléculas. Se detectó un incremento en los ARN mensajeros correspondientes a los receptores adrenérgicos $\alpha 1B$ y $\alpha 1D$ en respuesta al tratamiento estrogénico de 12 y 24 h. También se observó un incremento significativo en los niveles de ARN mensajeros de GPR54 y KiSS-1 a las 24 horas del tratamiento. Dado que estas moléculas están implicadas en vías de transducción que conllevan a la estimulación de la secreción de la GnRH, se propone que éste podría ser un mecanismo implicado en la señal estrogénica de retroalimentación positiva. Por otra parte, en las células GT1-7 se detectó la expresión del receptor membranal a estradiol recientemente descubierto, el GPR30. Estos resultados apoyan la existencia de un nuevo mecanismo de acción directa del estradiol sobre las neuronas GnRHérgicas, que actuaría de manera complementaria a las acciones indirectas ya conocidas.

2. ABSTRACT

Estradiol plays a critical role in the feedback regulation of reproduction, in part *via* modulating the neurosecretory activity of GnRH neurons. Indirect actions of estradiol on GnRH neurons have been clearly demonstrated, while direct effects are still controversial. In the current study, we examined direct effects of 17 β -estradiol on the expression of receptors for afferent signals at the level of the GnRH neuron, using GT1-7 cells. This immortalized model of GnRH-secreting hypothalamic neurons has been extensively employed to study direct actions of several modulators of GnRH gene expression and secretion. In this analysis we tested an array of G-protein-coupled receptors including synaptic receptors (the nine known adrenergic receptors (AR) and GPR54, the receptor for kisspeptin) as well as an endocrine receptor (the novel membrane estrogenic receptor GPR30). Using RT-PCR we confirmed the expression of mRNAs for α 1A-, α 1B-, α 1D-, α 2A-, α 2C-, and β 1-AR, and showed for the first time that mRNAs for α 2B-, β 2- and β 3-AR, for kisspeptin and its receptor GPR54, and for GPR30 are expressed in GT1-7 cells. Expression levels of all of these mRNAs were determined by real-time PCR after treatment of GT1-7 cells with 17 β -estradiol (10nM). We found both rapid and delayed transcription responses. α 1B-AR mRNA expression was significantly increased (14-fold) in response to estradiol after 6 hours, while α 1B- and α 1D-AR mRNA expression were significantly increased (19- and 23-fold, respectively) after 24 hours. The expression of KiSS-1 and GPR54 mRNAs were also significantly increased (8- and 6-fold, respectively) after 24 hour treatment of GT1-7 cells with estradiol. GPR30 mRNA expression was not affected by estradiol. Our data also showed that 1 and 10 nM kisspeptin-10, when added to the culture media for 30 minutes, can significantly stimulate GnRH release and GnRH mRNA expression in GT1-7 cells

These results suggest that the complex physiologic effects of estradiol on the function of the reproductive axis could be mediated partly through direct modulation of the expression of receptors for afferent signals in GnRH neurons.

3. INTRODUCCIÓN

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 ó GnRH (por sus siglas en ingles). Entre los mecanismos que controlan la secreción de las gonadotropinas destacan las asas de retroalimentación positiva y negativa por parte del estradiol. La aparente ausencia de receptores a estrógenos en las neuronas GnRHérgicas llevó a suponer que estas asas de retroalimentación actuaban únicamente 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, posterior al descubrimiento de un segundo receptor a estrógenos, y mediante métodos analíticos de alta sensibilidad se ha encontrado la expresión de estas moléculas en neuronas GnRHérgicas *in situ* y en líneas celulares inmortalizadas como las GT1.

En este estudio se analizó en neuronas GnRHérgicas GT1-7, el efecto del 17β -estradiol sobre la expresión de receptores a señales que regulan la secreción de la GnRH, como lo es la norepinefrina, un catecolamina con implicaciones facilitadoras de la secreción de la GnRH, así como de la kisspeptina, un muy potente estimulador de la secreción de la GnRH recientemente descubierto, al cual se le atribuye un papel esencial en el establecimiento de la pubertad. Además, también se analizó la expresión del receptor a estrógenos membranal recientemente descubierto, el GPR30.

A continuación se describen a grandes rasgos el eje reproductivo y el modelo utilizado de neuronas GnRHérgicas. Posteriormente se presentan a los moduladores de este sistema que fueron considerados en el presente estudio; los estrógenos, la norepinefrina y las kisspeptinas, describiéndose sus mecanismos de acción y a los receptores que median sus acciones. Finalmente se muestran los resultados obtenidos en el análisis experimental.

4. ANTECEDENTES

4.1 EJE REPRODUCTIVO

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 percibidos y procesados por el cerebro, convergen en 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, razón por la cual no parecen estar 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-hipofisario. 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-hipófisis-gonadas (HHG), también conocido como eje reproductivo.

El presente estudio se enfoca al estudio de los mecanismos de acción de las hormonas que regulan la ovulación. En las hembras, 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 neuroendócrinos. Estos eventos neuroendócrinos modulan el crecimiento y la diferenciación de los folículos ováricos. Entre las hormonas que intervienen se incluye a las gonadotropinas; es decir a la hormona estimulante del folículo y a la hormona luteinizante (FSH y LH, respectivamente por sus siglas en inglés). También participan la prolactina y las hormonas secretadas por el ovario, en particular los estrógenos, así como las hormonas de las adrenales y las hormonas reguladoras del metabolismo, como las hormonas tiroideas y la hormona del crecimiento. Por su parte, participan neurotransmisores clásicos y péptidos que llegan al ovario 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 adenohipofisis por células especializadas, denominadas gonadotropos, que son capaces de producir una o ambas hormonas (Domínguez, 1993). En las hembras, la FSH estimula en los ovarios el desarrollo del óvulo cada ciclo estral o menstrual. La FSH también actúa sobre las células de la granulosa 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, lo que conlleva a 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 propiamente dicho. 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 a los esteroides sexuales masculinos. 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 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 hipotalámica 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). El control que ejerce esta hormona sobre el ciclo reproductor depende de su secreción sostenida y pulsátil (Kordon et al., 1994).

4.2 NEURONAS GnRHÉRGICAS INMORTALIZADAS: CÉLULAS GT1

A pesar de la enorme importancia de este sistema neuronal que regula al eje HHG, muchas preguntas fundamentales acerca de su funcionamiento permanecen sin respuesta. Esto es debido a que su estudio se dificulta por la distribución difusa de estas 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, las técnicas de tumorigénesis genéticamente dirigida en ratones transgénicos, han permitido establecer líneas neuronales inmortales altamente diferenciadas con utilidad experimental. Entre las líneas celulares de neuronas GnRHérgicas immortalizadas que se han desarrollado se encuentra la línea GT1 (Weiner, et al., 1992). Esta línea celular se obtuvo utilizando 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. Se han obtenido tres líneas clonales derivadas de este cultivo 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 esta hormona, 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 neuromedadores, 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).

4.3 MODULADORES DE LA SECRECIÓN DE LA GnRH

El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas es modulado por la acción de una gran variedad de señales aferentes a la red GnRHérgica (Kordon et al., 1994). A pesar de la abundante literatura neuroanatómica y farmacológica disponible, que ha mostrado la compleja modulación aferente al sistema GnRHérgico, el papel desempeñado por cada uno de los posibles neuromediadores continúa siendo tema controversial. Entre otras causas, la incertidumbre parte de la posible dualidad de acciones de los neuromediadores; es decir, acciones directas sobre las neuronas GnRHérgicas, e indirectas a través de vías multisinápticas. En seguida se presentan tres importantes moduladores de la secreción de la GnRH, se describen sus mecanismos de acción y a los receptores mediante los cuales ejercen sus efectos.

4.3.1 ESTRÓGENOS

Los estrógenos son hormonas esteroides implicadas en una gran variedad de funciones biológicas, entre las que se incluye de la función reproductiva. Estas hormonas esteroides consisten en moléculas lipofílicas derivadas del colesterol, que son producidas principalmente por las gónadas y en menor cantidad por las glándulas adrenales. El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17β -estradiol, seguido por la estrona y el estriol. Cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 átomos de carbono, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo b-hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos (Duax et al., 1988). La testosterona es el precursor inmediato de los estrógenos, a través de una reacción que comprende la aromatización del anillo A, y que está catalizada por un complejo enzimático llamado P_{450} aromatasas que utiliza la forma reducida NADPH y oxígeno molecular como cosustratos (Miller y Larionov, 2004). La actividad de la aromatasas reside dentro de una glucoproteína transmembranal (familia P_{450} de monooxigenasas) (Corbin et al., 1988); también es esencial una flavoproteína omnipresente, la NADPH-citocromo P_{450} reductasa. Ambas proteínas se localizan en el retículo endoplásmico de células de la granulosa ovárica, células de Sertoli y de Leydig testiculares, células del estroma de tejido adiposo, sincitiotrofoblastos placentarios, blastocisto previo a la

implantación y en diversas regiones del cerebro. En las células de la granulosa ovárica la actividad de la aromatasas es inducida por las gonadotropinas, las cuales actúan por medio de receptores de membrana plasmática para incrementar las concentraciones intracelulares de AMP cíclico (AMPC). Las gonadotropinas también están involucradas en la facilitación del transporte del colesterol hacia las mitocondrias de células que sintetizan esteroides.

Los mecanismos mediante los cuales los estrógenos ejercen sus acciones de manera general consisten en la modulación de proteínas, lo cual ocurre tras su difusión hacia el interior de la célula en donde es capaz de modular la expresión de genes mediante mecanismos que van desde la regulación de la transcripción y de la vida media de los ARN mensajeros, hasta la activación de vías de señalización celular. A continuación se describen a detalle los receptores a estrógenos actualmente conocidos.

A finales de la década de 1950 dos químicos orgánicos Herbert Jacobson y Elwood V. Jensen, quienes estudiaban efectos biológicos de hormonas estrogénicas sintetizaron estradiol radioactivo marcado con [³H], el cual presentaba una alta actividad. Con este trazador procedieron a estudiar la distribución específica; es decir, la especificidad de esta hormona por ciertos tejidos blanco (útero, vagina y pituitaria anterior), lo que los llevó a proponer por primera vez el concepto de “receptor a estrógenos” (Jensen et al., 1967). Esto fue altamente controversial en esa época, puesto que se consideraba como mecanismo de acción estrogénica a un proceso enzimático en el que mediante “transhidrogenaciones” de las moléculas estrogénicas éstas ejercían sus efectos (Jensen 1992). El concepto de “receptor a estrógenos” fue aceptado más tarde, después de algunas discusiones entre bioquímicos (Wurtman, 1968; Jensen, 1968), y finalmente con el descubrimiento de los mecanismos de acción estrogénica a nivel genómico.

Actualmente los receptores a estrógenos se clasifican como receptores nucleares y receptores membranales, los cuales participan en mecanismos de acción conocidos como clásicos y mecanismos no clásicos (también conocidos como efectos rápidos) respectivamente. Los receptores nucleares a estrógenos son parte de la familia de factores de transcripción dependientes de ligando, los cuales modulan la transcripción de genes que contienen una secuencia conocida como elemento de respuesta a estrógenos (ERE por sus siglas en inglés), una secuencia nucleotídica específica que

consiste en una secuencia palindrómica separada por tres nucleótidos que son variables (GGTCAnnnTGACC), típicamente se localiza en el extremo 5' de los genes de respuesta a estrógenos. Las modificaciones en la síntesis de proteínas en consecuencia a la modulación de la expresión génica, conllevan a los cambios celulares que son responsables de los efectos estrogénicos. En el caso de los receptores membranales, los cuales están acoplados a vías de señalización celular, al ser activados inducen modificaciones celulares en periodos muy cortos de tiempo (desde segundos). A continuación se describen la estructura y la función de cada uno de los receptores a estrógenos actualmente conocidos.

El primer receptor a estrógenos descubierto fue el receptor nuclear llamado receptor a estrógenos α (RE α). Fue descrito en útero de rata y posteriormente clonado a partir de la línea celular de cáncer mamario humano MCF-7 (Walter et al., 1985; Drene et al., 1986). El RE α consiste en una proteína de 595 aminoácidos de un peso molecular de 66 kDa, que se compone de varios dominios funcionalmente diferentes (Kumar et al., 1986). El dominio de unión al ADN (DBD por sus siglas en inglés) también conocido como dominio C, contiene dos motivos con dedos de zinc. Este dominio es necesario y suficiente para la unión del RE α a los ERE. Al comparar entre varias especies la secuencia de aminoácidos del dominio C, se observó que es una región altamente conservada. El dominio de unión al ligando (LBD por sus siglas en inglés) ó dominio E, también es una región conservada y es la responsable de la interacción entre el receptor y varios estrógenos y antiestrógenos. Los otros dominios del RE α son regiones cuya secuencia de aminoácidos varía considerablemente entre especies, se incluyen el dominio A/B amino terminal, el dominio F carboxilo terminal, y el dominio D que corresponde a la región bisagra localizada centralmente. Dentro de los dominios A-F hay secuencias discretas de aminoácidos que son importantes en el mantenimiento de la función del receptor. Mediante análisis de secuencia y estudios funcionales de mutantes para el RE α , se han identificado dos regiones del receptor que son importantes en la inducción de la transcripción de los genes responsivos a estrógenos. La región llamada Función-1 de activación de la transcripción (AF-1) está localizada en el dominio A/B amino terminal del receptor, y actúa como un dominio de activación de la transcripción independiente del ligando. La región Función-2 de activación de la transcripción (AF-2) se localiza en el dominio de unión al ligando y actúa como un dominio de activación inducible por ligando (Ver figura 1).

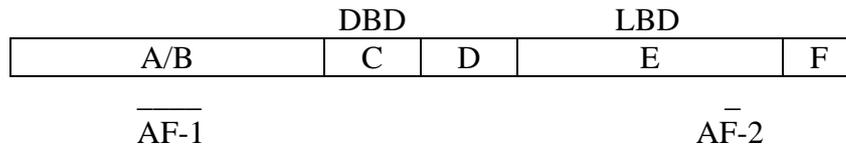


Figura 1. Estructura del RE α .

Para la modulación de la transcripción mediada por receptores nucleares es indispensable una previa dimerización de éstos, la cual ocurre tras una modificación en su conformación en respuesta a su unión con el ligando. La dimerización se efectúa a través de la interacción de los dominios C ó DBD de cada monómero, participando también los dominios E ó LBD. Una vez formado el complejo proteína-proteína-ligando se requiere la participación de proteínas conocidas como correguladores (coactivadores y corepresores), las cuales interactúan con la maquinaria de transcripción basal resultando en una modificación de ésta (Molenda et al., 2003).

A principios de la década de 1990, tras el descubrimiento del RE α y después de una intensa investigación en el campo de la biología de los estrógenos, se aceptó que este receptor era indispensable para la supervivencia. Hasta que en 1993 se generó un modelo knockout para el RE α . Ambos sexos resultaron ser infértiles y sin conducta sexual, y fue propuesto que la ausencia de letalidad fue debida a que el RE α sí fue expresado en etapas tempranas del desarrollo (Lubahn et al., 1993). Posteriormente fue reportado un caso clínico en el que un hombre no presentaba el RE α de manera funcional (Smith et al., 1994). Esta persona presentaba una severa osteoporosis y una reducida fertilidad. Este hallazgo definitivamente invalidó la hipótesis en la que se proponía que la delección del RE α sería letal. Posteriormente en 1996 fue descubierto un segundo receptor a estrógenos, el cual fue nombrado RE β , y fue detectado y clonado a partir de la próstata de la rata (Kuiper, et al., 1996). En humano este receptor consiste en una proteína de 530 aminoácidos y un peso molecular de 59 kDa (Mosselman et al., 1996; Ogawa et al., 1998). Es homólogo al previamente identificado RE α , particularmente en el dominio de unión al ADN (95% de similaridad en la secuencia de aminoácidos), por lo que ambos RE se unen a secuencias de ADN responsivas a estrógenos muy similares, además de interactuar formando complejos heterodiméricos RE α -RE β (Pettersson, et al., 1997; Pace et al., 1997). En el dominio de unión al ligando presentan un 55% de similitud en la secuencia de aminoácidos. La

afinidad por el ligando también es similar a la del RE α , el cual presenta una constante de disociación por el 17 β -estradiol de 0.13 nM, siendo de 0.12 nM para el RE β (Kuiper et al., 1997). En cambio, en la región de activación transcripcional AF-1 del dominio A/B amino terminal, existen importantes diferencias que conllevan a respuestas opuestas de transactivación ante un mismo ligando (McInerney et al., 1998). En cuanto a su distribución en los diferentes tejidos, se ha reportado que el RE α se expresa de manera abundante en pituitaria, vagina, útero, epidídimo y testículo mientras que el RE β es abundante en ovario y próstata; la coexpresión de ambos receptores se ha visto en pituitaria, hipotálamo, timo, útero y ovario (Kuiper et al., 1997; Dechering et al., 2000). Con base en los dos últimos aspectos mencionados, las diferencias en el dominio de activación transcripcional y en su distribución entre los diferentes tejidos, se ha sugerido que existen diferencias funcionales entre el RE α y el RE β . Se ha propuesto que la existencia de dos diferentes RE nucleares, los cuales son capaces de heterodimerizar, podría explicar la gran variedad de efectos biológicos de los estrógenos. Se han realizado estudios en donde se ha observado que el tipo de proteínas coreguladoras que interaccionan con el complejo ligando-dímero, varía según sea el caso de homodímeros del RE α , RE β o de heterodímeros RE α -RE β , variando entonces el efecto final (ver Dechering et al., 2000). Por otra parte, se han descrito variantes del RE β , las cuales son producto del procesamiento del ARN mensajero por corte y empalme, siendo estas isoformas variables entre especies (ver Nilsson et al., 2001). Sin embargo, todavía no se ha establecido el significado biológico de estas variantes debido a que no se han identificado en la mayoría de los casos a sus proteínas correspondientes. Lo mismo ocurre en el caso del RE α , del cual también se han reportado variantes del transcrito por corte y empalme (ver Murphy et al., 1997; Fuqua y Wolf, 1995).

En cuanto a los mecanismos de acción estrogénica no genómicos, sus efectos fueron observados en estudios iniciales de este campo. En diferentes análisis se observaron incrementos en AMP cíclico por efecto de estrógenos en diversos tejidos y especies (Rosenfeld y O'Malley, 1970; Kissel et al., 1970; Weissman y Skolnick, 1975; Kobayashi et al., 1975). Sin embargo, el descubrimiento del receptor a estrógenos clásico, con características de factor de transcripción dependiente de ligando, disminuyó el interés por investigar sobre el mecanismo por el cual los estrógenos inducen activación de adenilato ciclasas. Durante la década de 1990 surgieron varios estudios en

los que se observó la activación de segundos mensajeros como IP₃, Ca⁺² y cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK's, por sus siglas en inglés) (Hal et al., 2001; Kelly y Levin, 2001). Posteriormente se determinaron las vías de transducción que son activadas; sin embargo no se tenía una evidencia clara sobre la existencia de un receptor membranal implicado en la activación de estas señales (Ho y Liao, 2002; Govind y Thampan, 2003). Fue propuesta la participación de proteínas G en este tipo de señalización inducida por estrógenos (Razandi et al., 2003). También surgieron varios estudios que reportaron la presencia de RE en la membrana celular. Estos incluyen desde la existencia de una variante del RE α (Toran-Allerand et al., 2002), hasta la existencia de modificaciones postranscripcionales del RE α , como el procesamiento del ARN mensajero por corte y empalme (Li et al., 2003) ó modificaciones por palmitación (Acconcia et al., 2004) que permitieran el anclaje de este receptor en la membrana celular. Además de la participación de proteínas adaptadoras que reclutan al RE α translocándolo a la membrana, permitiendo así la activación de segundos mensajeros (ver Evinger y Levin, 2005; Boonyaratanakornkit y Edwards, 2004). Recientemente se descubrió un nuevo receptor a estrógenos, el receptor GPR30 (Hewitt et al., 2005). Es una proteína transmembranal acoplada a proteínas G que a diferencia de los RE nucleares, presenta una alta selectividad para estradiol y una muy baja para otros esteroides como estrona y estriol (Thomas et al., 2005). Este receptor formaba parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés) huérfanos, puesto que no se conocía su ligando. Esta molécula fue clonada a finales de la década de 1990 como resultado de la elaboración de una biblioteca genómica de GPCR (O'Dowd et al., 1998). En el año 2000 se identificó su función como receptor a estradiol; se reportó la activación de proteínas de la vía de las MAPK's, el Erk-1 y Erk-2 en respuesta a 17 β -estradiol y a los antagonistas estrogénicos ICI 182,780 y tamoxifen (Filardo et al., 2000). Un segundo reporte describió una segunda fase de la vía de señalización activada por este receptor, en donde se demostró la activación de adenilato ciclasas, lo que conlleva a un incremento en AMP cíclico que resulta en la inactivación de Erk-1 y Erk-2, los cuales fueron activados inicialmente (Filardo et al., 2002). Hasta el momento el estudio de este receptor se ha enfocado al área de investigación relacionada con el cáncer, se ha estudiado su participación en proliferación celular y apoptosis de diversas células cancerosas, y muy recientemente se ha iniciado el estudio de este receptor a nivel de sistema nervioso central (Brailoiu et al 2007), pero todavía no

existen reportes acerca de su participación en otros sistemas que son blanco de los estrógenos como es el caso del sistema reproductivo. El descubrimiento de este receptor ha contribuido de manera importante a la comprensión de los mecanismos de acción estrogénicos. Es bien conocida la existencia de efectos estrogénicos contradictorios, como efectos agonistas y antagonistas de un mismo fármaco sobre determinados tejidos, que ahora podrían explicarse con la existencia de un receptor membranal que es activado con los fármacos que clásicamente se habían utilizado para bloquear los efectos mediados por los receptores nucleares.

En cuanto a lo que se conoce sobre la participación de los estrógenos en la función reproductiva, es claro que en todos los procesos que intervienen en la síntesis y liberación de la GnRH (tasa de transcripción, estabilidad del ARN 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 más importantes es el mecanismo de retroalimentación ejercido por los esteroides gonadales. El concepto de que los esteroides 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 (Melcangi et al., 2002).

En el caso de hembras adultas, los estrógenos ejercen una influencia estimuladora (retroalimentación positiva) sobre la secreción de la GnRH actuando a nivel de la eminencia media, cuando se inicia el pico preovulatorio de LH (Caraty et al., 1989; Evans et al., 1995). Para que 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 (Herbison, 1998). En cuanto a los efectos inhibidores de las hormonas esteroides (retroalimentación negativa), se observó que en animales de ambos sexos, la remoción de 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; Richardson et al., 1992; Chongthammakun y Terasawa, 1993; Evans et al., 1995). En comparación con la influencia estimuladora, la influencia inhibidora 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 contradictorios. Varios laboratorios reportaron incrementos, decrementos y ausencia de efectos sobre los niveles del ARN 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 (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 también resultados contradictorios. Se reportó que el ARN mensajero de 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 de este gen 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, la noción clásica consideraba que los estrógenos no actúan de manera directa sobre las neuronas GnRHérgicas. Esta suposición surgió a partir de investigaciones basadas en técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, en las cuales se pretendió detectar el receptor a estrógenos. Estos estudios dieron resultados que indicaron la ausencia de este tipo de receptores en las neuronas 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 consideró que los efectos estrogénicos directos mediante mecanismos de acción genómica clásicos no ocurren 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 (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 negativos como positivos (Herbison y Pape, 2001).

Sin embargo, posteriormente con el descubrimiento del segundo receptor a estrógenos (RE β) 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). 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 el RE α y que presentan estas proteínas funcionales (Poletti, 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.

Con base en el modelo clásico de acción de hormonas esteroides, que implica la unión del esteroide a receptores intracelulares, 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 (1 nM), disminuyen los niveles basales del ARN 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 17 β -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 dependientes de estrógenos (López et al., 1991; Splett, et al., 2003). Además, 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). También existen evidencias de efectos estrogénicos mediante mecanismos de acción no genómica o membranal en células GT1. La exposición por tan solo 5 a 60 minutos a dosis fisiológicas de 17β -estradiol impermeable a la membrana celular (acoplado a albúmina), modifica los niveles de AMP cíclico, además de modificar la secreción de la GnRH (Navarro et al., 2003). Con base en estos hallazgos, actualmente es más aceptado que la regulación del eje reproductivo por esteroides gonadales se efectúa por acción directa sobre las neuronas GnRHérgicas, además de la regulación por mecanismos indirectos, lo cual actualmente continúa siendo investigado (Mitchell, et al., 2003).

En el presente estudio se analizó en células GT1-7 el efecto del 17β -estradiol sobre la expresión génica de receptores a señales moduladoras de la secreción de la GnRH, como lo son la norepinefrina y las kisspeptina, las cuales se describirán a continuación.

4.3.2 NOREPINEFRINA

Como se mencionó anteriormente, 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) participa en el control de la secreción de las gonadotropinas. La NE fue uno de los primeros neurotransmisores que se encontraron involucrados en la regulación del pico preovulatorio de la LH, lo cual fue demostrado al bloquear la ovulación en conejas mediante la administración de antagonistas de receptores alfa adrenérgicos, y mediante la inducción de la ovulación administrando NE intraventricularmente (Sawyer et al., 1947; Sawyer et al., 1950; Sawyer, 1952). Posteriormente se encontró 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 hipofisaria de manera pulsátil y sincronizada con una alta correlación temporal con la liberación de la LH y la GnRH (Terasawa, et al., 1988).

Por otra parte, 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 $\alpha 1$ incluye a los subtipos $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, y $\alpha 1D$. Estos se encuentran asociados a proteínas G que activan a la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés), resultando en 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, demostrándose que son funcionales y que están acoplados a la inhibición de las adenilato ciclasas (Lee, et al., 1995).

Como anteriormente se mencionó, 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 moduladores de la secreción de la GnRH. Entre estos se encuentran las aferencias noradrenérgicas. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha encontrado una alta densidad del RE α en neuronas noradrenérgicas (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).

Actualmente también hay evidencia de efectos estrogénicos directos sobre neuronas GnRHérgicas que involucran modificaciones en la respuesta de estas células a señales noradrenérgicas. 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 interaccionar a nivel de vías de transducción intracelulares (Etgen, et al., 2001; Alonso-Solis, et al., 1996). Además, 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 α 1B-adrenérgicos del área preóptica. Además, esto se correlacionó con un incremento en los niveles del ARN mensajero correspondientes a este receptor (Karkanias, et al., 1996). Otras investigaciones apoyan la hipótesis de que la comunicación sináptica mediada por receptores adrenérgicos que modula la fisiología del eje reproductivo, es regulada por estrógenos. Algunas se basan en el análisis del

efecto del estradiol sobre los niveles de AMPc inducidos por NE en explantes hipotalámicos. Se ha demostrado que el incremento de este segundo mensajero inducido por NE, es modificado en respuesta a un 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 células GnRHérgicas GT1, pueden ser moduladas por estrógenos, causando una insensibilización de los adrenoreceptores (Martínez-Morales, et al., 2001).

Con base en los 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 los receptores adrenérgicos. Esto podría contribuir a la identificación de un nuevo mecanismo a nivel molecular mediante el cual se regula la liberación de la GnRH.

4.3.3. KISSPEPTINAS

Investigaciones recientes muestran que la familia de neuropéptidos nombrada kisspeptinas juega un rol principal en la regulación de la secreción de la GnRH., siendo esenciales en el proceso de la pubertad (De Roux et al, 2003; Seminara y Kaiser, 2005; Messenger, 2005a; Messenger, 2005b; Tena-Sempere, 2005; Aparicio, 2005; Vogel, 2005; Popa et al, 2005; Dungan et al., 2006). Estos neuropéptidos son codificados por el gen KiSS-1. El producto de la traducción del ARN mensajero de este gen es un polipéptido de 145 aminoácidos, que posteriormente es procesado a péptidos más pequeños, siendo el de 54 aminoácidos el más abundante en la circulación y tejidos. Fragmentos más cortos de 10 y 14 aminoácidos también se encuentran naturalmente con la misma función que la kisspeptina-54 (Kotani et al., 2001; Stafford et al., 2002; Harms et al., 2003). Este gen fue inicialmente descubierto en células de melanoma maligno humano, al buscar genes supresores de metástasis. Al producto de este gen que es procesado a 54 aminoácidos se le ha nombrado también metastina, debido a su efecto supresor de metástasis (Lee, 1996). El ARN mensajero de KiSS-1 se presenta principalmente en

placenta (Horikoshi et al., 2003) y cerebro. En éste se ha localizado en ganglios basales e hipotálamo (Muir et al., 2001), particularmente en el núcleo arcuato y el núcleo anteroventral periventricular (AVPV por sus siglas en inglés) (Irwig et al., 2004). Estas kisspeptinas actúan a través de un receptor acoplado a proteínas Gq/11, el receptor GPR54, que también ha sido nombrado hOT7T175, AXOR12 o Kiss-1R (Stafford et al., 2002). Inicialmente fue clonado a partir de rata mediante primers degenerados basados en secuencias conservadas presentes en dominios transmembranales (Lee et al., 1999). Este presenta un 40% de homología con los receptores de galanina. GPR54, también fue clonado en humanos y se expresa principalmente en placenta, cerebro y pituitaria (Kotani, et al., 2001; Ohtaki et al., 2001 y Muir et al, 2001), incluso se ha detectado en neuronas GnRHérgicas (Irwig et al, 2004; Messenger et al 2005a). Este receptor formaba parte del conjunto de receptores huérfanos acoplados a proteínas G, ya que se desconocía su ligando, y fue descrito en el año 2001 por tres grupos independientes. Los grupos de Kotani y Ohtaki, analizaron extractos peptídicos de placentas activadores de GPR54. El grupo de Muir utilizó una biblioteca de 1500 ligandos posibles. Los mejores agonistas demostraron una similitud al péptido de 54 aminoácidos derivado del gen KISS-1. Ahora se conoce que la estimulación de GPR54 por las kisspeptinas causa la activación de fosfolipasa C acoplada a proteína Gq (Muir et al., 2001).

Las kisspeptinas y GPR54 actualmente son consideradas moléculas cruciales en el proceso de la pubertad, debido a que alteraciones genéticas que causan pérdidas en su función alteran el desarrollo de la pubertad y las funciones reproductivas. GPR54 antes que las kisspeptinas, fue detectado como un importante mediador en el proceso de la pubertad. Al observar que un paciente con hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (HHI), no era el único de su familia con problemas en el desarrollo de la pubertad, se procedió a analizar a nivel genético a esta familia. Se encontró que ambos padres presentaban una mutación en una copia del gen que codifica para GPR54, y en todos los hijos se encontró una mutación puntual homocigota en este gen, siendo éste el principal defecto en estos pacientes (De Roux et al., 2003). Al mes siguiente, otro grupo de investigadores reportó que seis miembros de una familia árabe, todos previamente diagnosticados con HHI, tenían mutaciones en los genes correspondientes al GPR54 (Seminara et al., 2003). Y en ese mismo año se generó una línea de ratones con una mutación dirigida al gen que codifica para GPR54, los cuales se caracterizaron por presentar anormalidades en el desarrollo de las gónadas en animales de ambos sexos,

además de cambios histopatológicos en tejidos que normalmente presentan dimorfismo sexual (Funes et al., 2003). A partir de estos hallazgos se procedió a estudiar la función biológica de este receptor y su ligando, hasta demostrar que las kisspeptinas actúan sobre las neuronas GnRHérgicas estimulando la secreción de la GnRH (Thompson et al., 2004).

Hay literatura que sugiere que las kisspeptinas y el GPR54 son importantes no solo en el establecimiento de la pubertad, sino en el mantenimiento de la función normal de la reproducción en el adulto, lo cual es dependiente de esteroides sexuales. Ha sido demostrado que la expresión de KiSS-1 en hipotálamo, particularmente en área preóptica y núcleo arcuato, es modulada por hormonas gonadales (Navarro et al 2004; Irwig et al, 2004; Smith et al, 2005a; Smith et al, 2005b; Shahab et al 2005; Pompolo et al 2006). Lo cual también se ha observado para su receptor, el GPR54 (Navarro et al 2004; Shahab et al 2005).

En el presente trabajo se propuso evaluar la posibilidad de utilizar a la línea celular GT1-7 como modelo de estudio de estas moléculas. Para este fin se procedió a determinar si esta línea celular expresa GPR54 y KiSS-1, y si estas moléculas son moduladas por estradiol.

5. HIPÓTESIS

Los estrógenos regulan la expresión génica de las neuronas GnRHérgicas, particularmente de receptores a señales aferentes noradrenérgicas y kisspeptinérgicas. Este podría ser uno de los mecanismos estrogénicos en la modulación del eje reproductivo por acción directa sobre las neuronas GnRHérgicas.

6. OBJETIVOS

- Analizar de manera cualitativa la expresión de los ARN mensajeros correspondientes a los nueve subtipos de receptores adrenérgicos en neuronas GnRHérgicas de la línea celular GT1-7 y evaluar el efecto del 17 β -estradiol sobre los niveles basales de estas moléculas.
- Determinar si la línea celular GT1-7 expresa de manera funcional a las moléculas del sistema Kisspeptina/GPR54, y evaluar el efecto del 17 β -estradiol sobre los niveles basales de los ARN mensajeros correspondientes a éstas.
- Determinar si la línea celular GT1-7 expresa al ARN mensajero correspondiente al receptor a estrógenos membranar recientemente descubierto, el GPR30 y evaluar el efecto del 17 β -estradiol sobre los niveles basales de esta molécula.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO

En el presente trabajo se utilizó la línea celular GT1-7, entre los pases 17 y 25. Se cultivaron en placas de cultivo 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 placas de cultivo 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 una concentración de 10 nM por periodos de 3, 6, 12 ó 24 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 (0.001%). Posteriormente cada uno de los cultivos fue procesado de manera independiente.

Para la cuantificación de la secreción de GnRH se cultivaron 4 x 10⁶ células en placas de cultivo de 60 mm. Estos cultivos se trataron por 30 minutos con kisspeptina-10 (SIGMA) a concentraciones de 0, 1, 10 o 100 nM. El medio fue colectado, liofilizado y almacenado a -80°C hasta ser analizado.

7.2 EXTRACCIÓN DE ARN, TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Inmediatamente después del período de tratamiento estrogénico se procedió a extraer el ARN total de cada uno de los cultivos. La extracción de ARN 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 placa de cultivo 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 ARN total en una membrana de silica, y se lavó para remover contaminantes. Finalmente se sometió a un tratamiento con ADNasas para eliminar la presencia de ADN genómico. El ARN total se eluyó de la membrana en agua libre de ARNasas. El material así extraído se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se identificó por incorporación de SYBR Gold (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) para verificar su integridad. Finalmente fue cuantificado por espectrofotometría.

A partir del ARN total extraído de cada uno de los cultivos de células GT1-7, se sintetizó una cadena complementaria de ADN (cDNA por sus siglas en ingles) mediante transcripción reversa (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 ARN 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 por PCR un fragmento de 173 pb correspondiente al gen de βactina, un gen de expresión constitutiva.

Las reacciones de PCR convencional se corrieron en volúmenes totales de 20 µl, conteniendo una solución amortiguadora con deoxinucleótidos, MgCl, Taq polimerasa, y oligonucleótidos iniciadores diseñados específicamente para cada reacción, los cuales se describen en la tabla 1. Como control positivo se utilizó cDNA de cerebro de ratón. Los controles negativos incluyeron reacciones sin templado o con ARN de células GT1-7 sin retrotranscribir. Estas reacciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer Geneamp 2400 bajo las siguientes condiciones: una fase inicial de desnaturalización por 2 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura media de hibridación específica para cada reacción (ver tabla 1) y 45 segundos a 72°C. Finalmente una fase de extensión durante 7 minutos a 72°C. Los productos obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en

gel de agarosa teñidos con SYBR Gold, y mediante secuenciación automática con un ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos iniciadores diseñados para PCR.

OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES			
PRODUCTO DE INTERES	SECUENCIAS (5'-3')	TEMPERATURA MEDIA DE HIBRIDACIÓN (°C)	TAMAÑO DEL PRODUCTO (bp)
RA α 1A	fw: TCTTCCATGCCCCAGGGAT rw: CTAGACTTCTCCCCGTTTTCCACC	63	201
RA α 1B	fw: AGTAGCCCAGCCAGAACA rw: GAAGGAAATGTCCAACCTCAA	63	289
RA α 1D	fw: TTGGGCCGCTACAGAGACC rw: TTTGGATCCGAAGGCAGAATC	63	296
RA α 2A	fw: GTGTTACCTCCCCTTGCTGT rw: TGTAACACGAAGTCTCCGC	63	88
RA α 2B	fw: CTGTTGGCTTACAGGTGGCT rw: AGGACAAATGTGCTGTTCCC	63	165
RA α 2C	fw: GCCTGTGCTATCTCTCCTCC rw: AACCACACCAAGAAAGGAGC	63	113
RA β 1	fw: GAGCTCTGGACTTCGGTAGATG rw: GCAGCTGTCGATCTTCTTTACC	63	390
RA β 2	fw: TGGTCATCCTGATGGTATGG rw: CCGGGAATAGACAAAGACCA	63	242
RA β 3	fw: CCGTGGCCTCACAGAAAC rw: CCCATGGTACTCCTGGCAAC	63	184
GPR54	fw: CTGCCACAGACGTCACTTTC rw: ACATACCAGCGGTCCACACT	63	176
KiSS-1	fw: AGCTGCTGCTTCTCCTCTGT rw: AGGCTTGCTCTCTGCATACC	63	151
GPR30	fw: TAACAGAGCAGCGATCTGGA rw: GTGTGAGTGTGAGGCTTGG	63	153
GnRH	fw: CTA CTGCTGACTGTGTGTTTG rw: CATCTTCTTCTGCCTGGCTTC	60	242
β -actina	fw:CCATCATGAAGTGTGACGTTG rw:ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA	58	173

7.3 PCR EN TIEMPO REAL

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, en la modalidad tiempo real, es un método muy sensible para la cuantificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Incluye simultáneamente la amplificación y el análisis de la muestra sin requerir que ésta sea manipulada. 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 ADN de doble cadena y al ser oxidado fluoresce. La fluorescencia emitida por el SYBR[®] Green es directamente proporcional al número de copias de ADN obtenido en cada ciclo del PCR y es monitoreada durante cada ciclo de la reacción. Debido a que en la primera fase del proceso de amplificación de un fragmento de ADN 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 inglés 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

ADN en diferentes muestras, los resultados del gen a cuantificar deberán ser normalizados con una referencia, para lo cual se emplea un gen presuntamente invariable. Con base en 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 Cp de la muestra y los valores de Cp 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).

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

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

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

Tabla 1. Cálculos realizados para el análisis de resultados, donde Cp es el ciclo de la reacción que correlaciona la cantidad inicial de muestra. El resultado final es expresado como cantidad relativa de fragmentos de cDNA a cuantificar, lo cual equivale a la expresión relativa del gen de interés.

Previamente a la realización del PCR en tiempo real, se determinaron las condiciones óptimas para cada reacción. Mediante PCR con gradiente de temperatura en un rango de 52.9 a 67.6°C, se procedió a determinar la temperatura media de hibridación adecuada para cada uno de los oligonucleótidos iniciadores a utilizados (sus características se describen en la tabla 1). Para esto, se utilizó como templado un cDNA de cerebro de ratón, en donde ya se conocía que son expresadas todas las moléculas que se analizaron. Para la cuantificación por PCR en tiempo real se utilizó el LightCyclerTM (Roche Biochemicals). Cada mezcla de reacción contenía 1 µl de cDNA, 0.6 µl de oligonucleótidos sentido y antisentido en una concentración 4 uM, 6 µl de la mezcla de reacción SYBR[®] Green taq Ready MixTM (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 a ésta (hot start), después 45 ciclos en los que durante 2 seg se somete a 94° C para la desnaturalización del cDNA, seguido de 8 seg a la temperatura media de hibridación de cada uno de los oligonucleotidos iniciadores (ver tabla 1) y 10 seg a 72° C para el proceso de polimerización. 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 ADN correspondientes al producto amplificado, esta temperatura es específica para cada fragmento de ADN 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 LightCyclerTM 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.

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.

7.4 MEDICIÓN DE GnRH

La secreción de la GnRH fue analizada mediante un inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés) de un estuche comercial (LHRH-EIA Kit, BACHEM). Las muestras liofilizadas y los péptidos estándares fueron rehidratados en una solución amortiguadora para EIA. Enseguida se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en 0.5 volúmenes del anticuerpo primario y de GnRH biotinilizada en una placa de 96 pozos diseñada específicamente para la unión del anticuerpo primario. Los pozos fueron lavados cinco veces con la solución amortiguadora para EIA, se adicionó una peroxidasa conjugada con estreptoavidina y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. La placa fue lavada cinco veces con el amortiguador de EIA y se adicionaron 100 μl de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina dihidroclorido, seguido de 15 minutos de incubación. La reacción fue detenida adicionando HCl 2 N y el color producido en la reacción fue medido por absorbancia a 450 nm en un lector de placas. Se realizó una curva estándar con la que se determinaron las cantidades de GnRH de las muestras experimentales. Todas las muestras de un experimento fueron analizadas en el mismo ensayo. El rango de detección fue de 0.016 a 25 ng/ml.

7.5 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.

8. RESULTADOS

EXPRESIÓN DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS, GPR54, KiSS-1 Y GPR30 EN CÉLULAS GT1-7

Mediante RT-PCR se analizó la expresión de los nueve RA conocidos (α 1A, α 1B, α 1D, α 2A, α 2B, α 2C, β 1, β 2, y β 3), como también de GPR54, KiSS-1 y GPR30 en las células GT1-7. Se encontró que en todos los casos resultó amplificado un único producto del tamaño esperado, al igual que en los controles positivos en donde se utilizó cDNA de cerebro de ratón (ver fig. 1). La autenticidad de los productos amplificados fue verificada por secuenciación automática de ADN, lo cual mostró identidad con las secuencias reportadas por el Banco de Genes. Con estos datos se confirma que las células GT1-7 expresan a los RA α 1A, α 1B, α 1D, α 2A, α 2C y β 1, y se presenta por primera vez la expresión de los RA α 2B, β 2 y β 3, además de las moléculas recientemente descubiertas GPR54, KiSS-1 y GPR30.

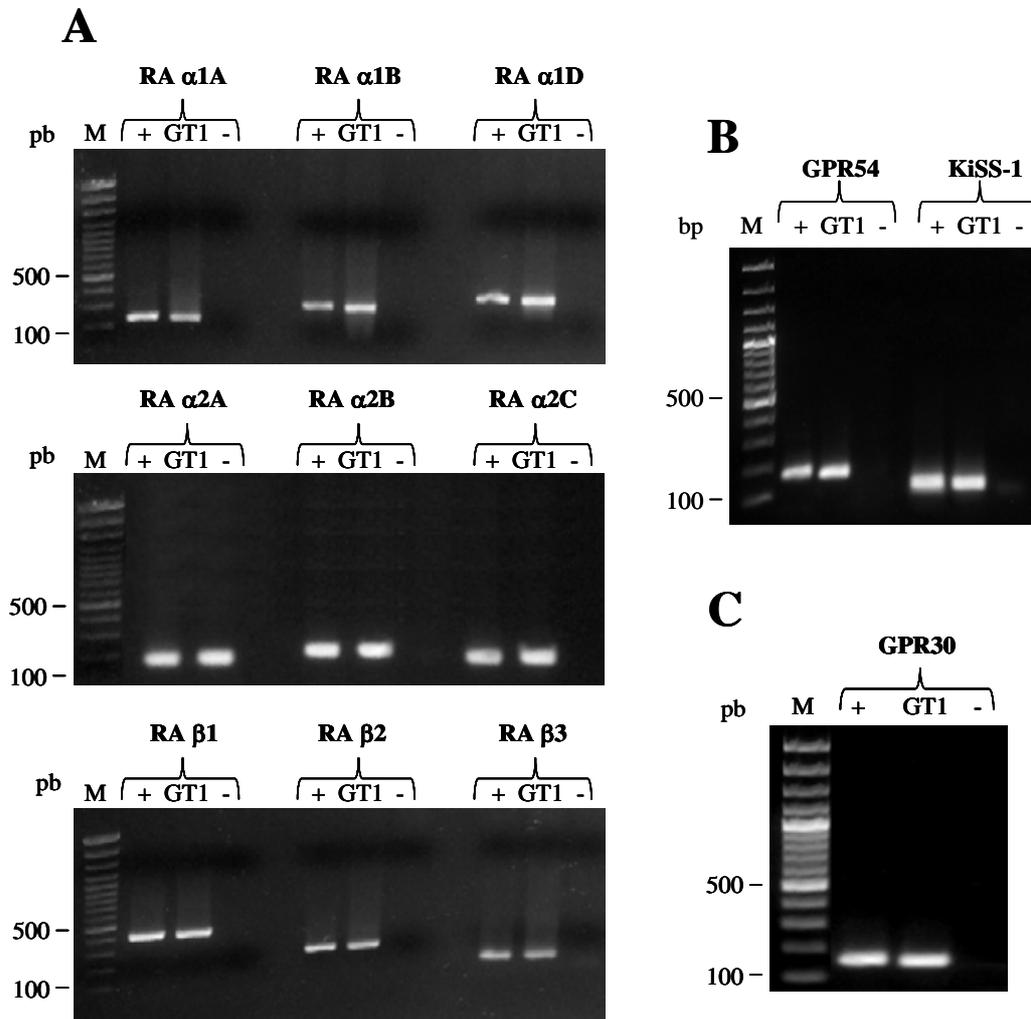


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR correspondientes a los nueve receptores adrenérgicos (RA), GPR54, KiSS-1 y GPR30 realizados a partir de extractos de células GT1-7 (GT1), cerebro de ratón como control positivo (+) y ARN sin retrotranscribir como control negativo (-). Marcador molecular de ADN (M).

EFFECTO DEL 17 β -ESTRADIOL SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS, GPR54, KISS-1, Y GPR30 EN CÉLULAS GT1-7.

El efecto del 17 β -estradiol (10 nM por 3, 6, 12 y 24 h) sobre el nivel de expresión de los ARNm de cada molécula analizada en las células GT1-7, se determinó mediante PCR en tiempo real. Los datos fueron analizados mediante el método $\Delta\Delta C$ como se describe en la metodología, el cual proporciona una cuantificación relativa. Se encontró que el estradiol incrementó significativamente (14 veces) la expresión del ARNm correspondiente al RA α 1B a las 6 horas del tratamiento, lo cual ocurrió nuevamente a las 24 horas (19 veces) (ver fig. 2B). La expresión del RA α 1D también se vio modificada a las 24 h del tratamiento, donde incrementó 23 veces (ver fig. 2C). En el caso de los RA α 1A, α 2A, α 2B, α 2C, β 1, y β 3 se observó una tendencia a ser incrementados, la cual no es estadísticamente significativa (el incremento no fue mayor a 3 veces) (fig. 2A, 3 y 4).

Figura 2. Efecto del 17 β -estradiol (10 nM) sobre la expresión de los ARNm de los RA α 1A (A), α 1B (B), y α 1D (C) en células GT1-7.

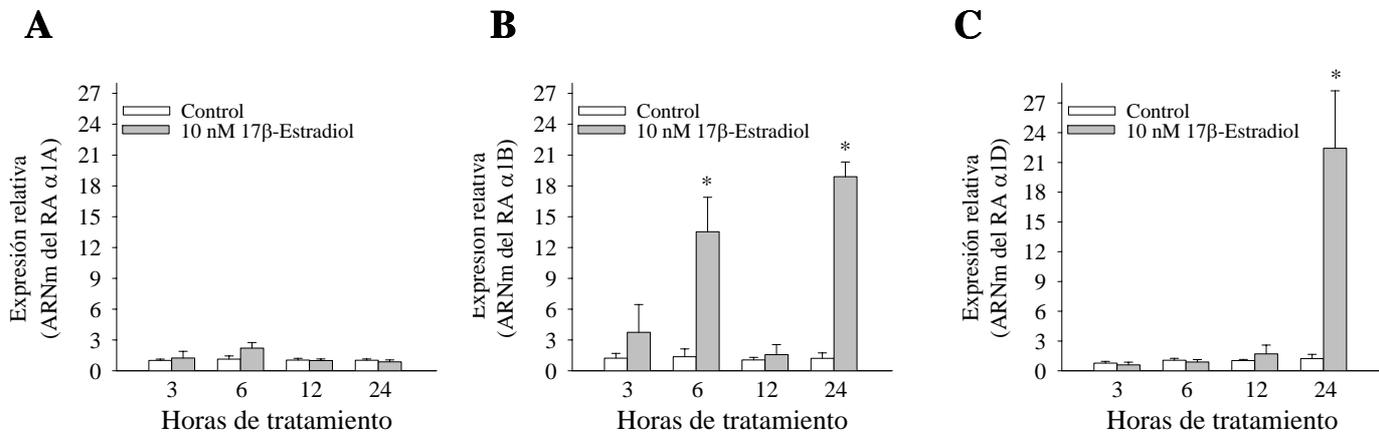


Figura 3. Efecto del 17 β -estradiol (10 nM) sobre la expresión de los ARNm de los RA α 2A (A), α 2B (B), y α 2C-AR (C) en células GT1-7.

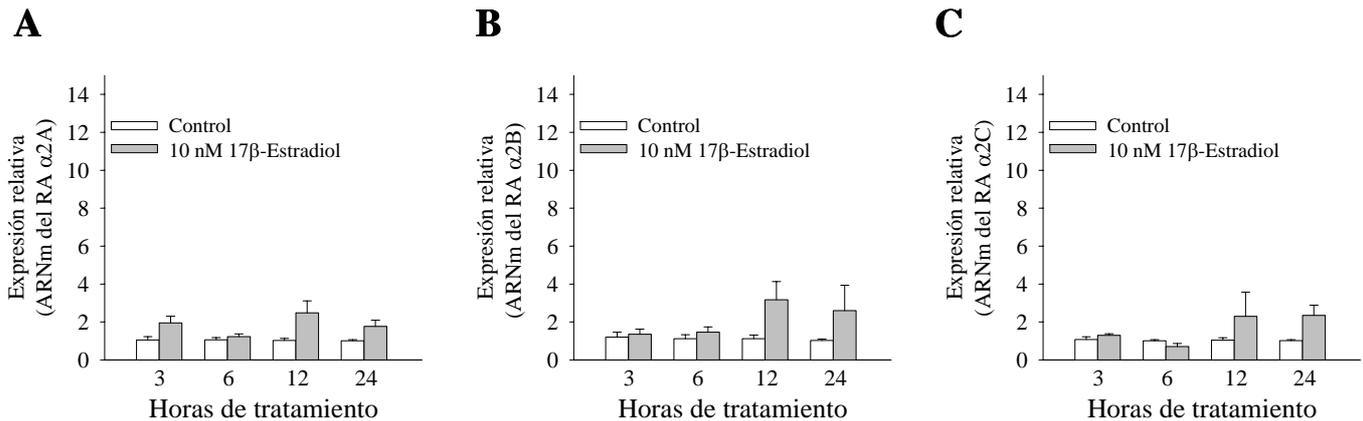
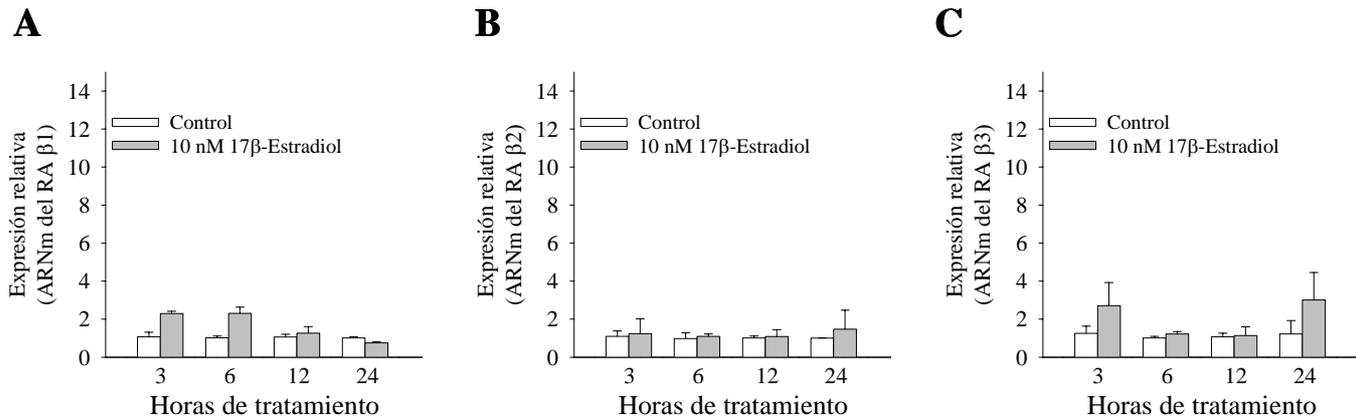
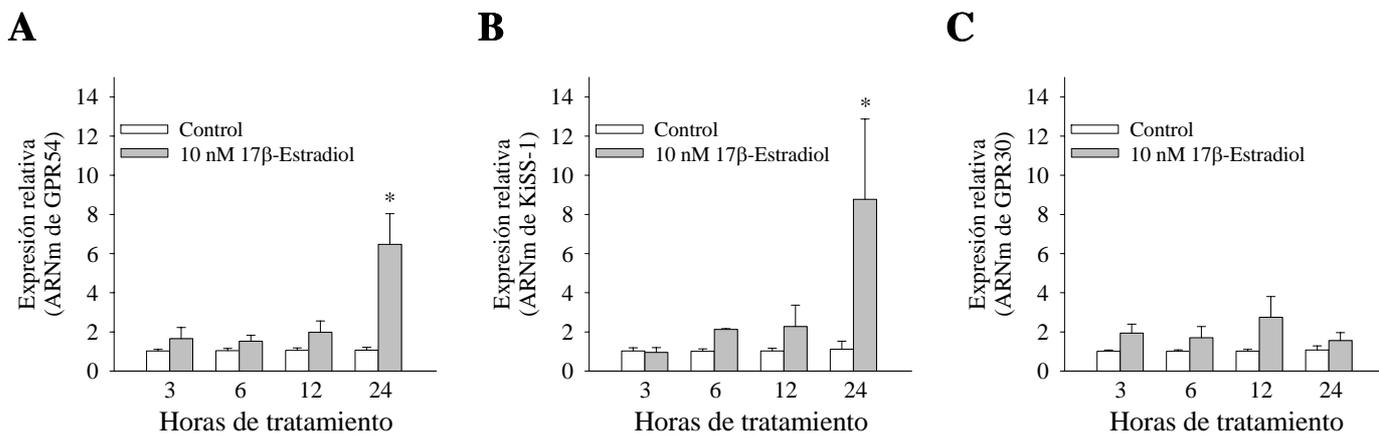


Figura 4. Efecto del 17 β -estradiol (10 nM) sobre la expresión de los ARNm de los RA β 1 (A), β 2 (B) y β 3 (C) en células GT1-7.



Por otra parte, el efecto observado en la expresión de GPR54 consiste en un incremento significativo de 6 veces a las 24 h del tratamiento (ver fig. 5B), efecto que también fue observado en la expresión de KiSS-1, el cual se incrementó 8 veces en respuesta al mismo tratamiento estrogénico (ver fig. 5B). En cuanto a la expresión del GPR30, no fue afectada significativamente por el estradiol aunque mostró una tendencia a incrementarse (ver fig. 5C).

Figura 5. Efecto del 17 β -estradiol (10 nM) sobre la expresión de los ARNm de GPR54 (A), KiSS-1 (B) y GPR30 (C) en células GT1-7.

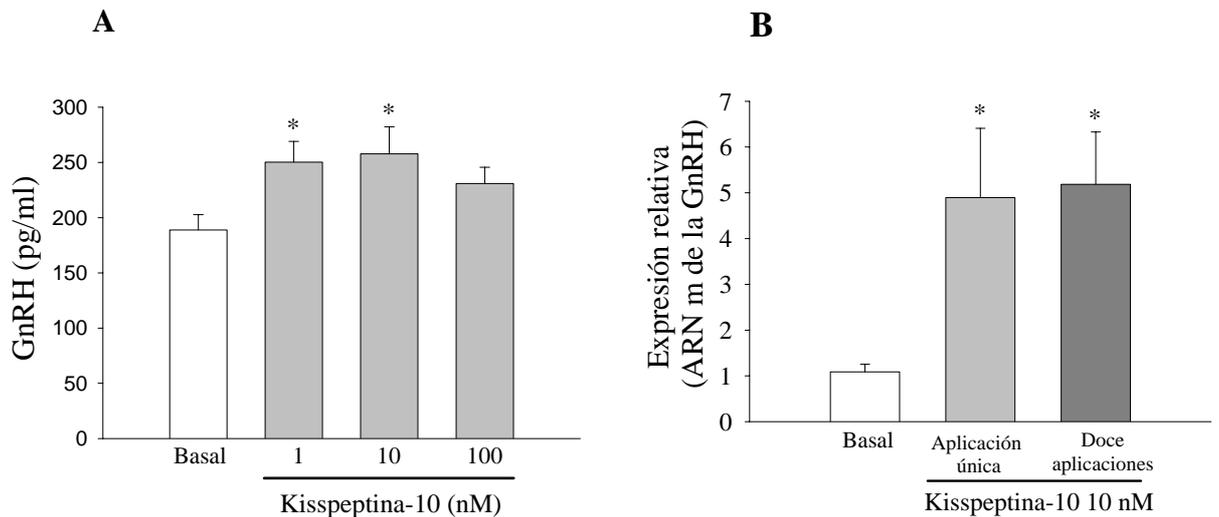


EFFECTO DE LA KISSPEPTINA-10 SOBRE LA SECRECIÓN Y EXPRESIÓN DE GnRH EN CÉLULAS GT1-7

Con el objeto de determinar si las células GT1-7 expresan de manera funcional al receptor GPR54, se procedió a analizar su activación mediante la medición de la GnRH secretada al medio en respuesta a la señal kisspeptinérgica. Cultivos de células

GT1-7 fueron tratados por periodos de 30 min con kisspeptina-10 a dosis de 1.0, 10 ó 100 nM. Mediante un inmunoensayo enzimático se determinó el nivel de GnRH secretado por estas células. Se encontró un incremento significativo en la secreción de la GnRH en respuesta al tratamiento de kisspeptina-10 a concentraciones de 1 y 10 nM (Fig. 6 A). Adicionalmente se determinó el efecto de la kisspeptina-10 sobre la expresión del ARN mensajero de la GnRH, para lo cual se trataron los cultivos con kisspeptina-10 a una concentración de 10 nM y se analizaron por RT-PCR en tiempo real 24 h después de aplicar el tratamiento. Se observó que tanto en los cultivos tratados con una sola aplicación de la kisspeptina-10 como en los tratados con aplicaciones intermitentes (una cada 30 min durante 6 horas), se incrementó el nivel de ARN mensajero de la GnRH 5 veces (Fig. 6 B). Estos resultados muestran la expresión funcional del GPR54 en neuronas GnRHérgicas inmortalizadas de la línea celular GT1-7, además de demostrar que en el proceso de estimulación de la secreción de la GnRH por efecto de la Kisspeptina, está involucrado un mecanismo transcripcional, ya que este péptido además de incrementar la secreción de la GnRH también aumenta la expresión de su ARN mensajero.

Figura 6. Efecto de la kisspeptina-10 sobre la secreción (A) y expresión (B) de la GnRH en células GT1-7.



9. DISCUSIÓN

La topología anatómica del sistema GnRHérgico ha generado la incertidumbre de si los efectos extrínsecos de diversas señales incluyendo a los esteroides sexuales, son ejercidos de manera directa sobre las neuronas GnRHérgicas, ó si estos operan indirectamente modulando a los sistemas neuronales aferentes a estas células. La baja densidad y distribución difusa de las neuronas GnRHérgicas han impedido su aislamiento y dificultado su caracterización desde una perspectiva analítica. El uso de líneas celulares que son útiles como modelos para el estudio de la fisiología de las neuronas GnRHérgicas, ha facilitado la comprensión de los mecanismos que subyacen a la regulación de la secreción de la GnRH. Las células GT1 han sido exhaustiva y exitosamente usadas en el estudio de mecanismos intrínsecos a las neuronas GnRHérgicas, como también en el estudio de mecanismos regulatorios extrínsecos activados por neuromediadores producidos por aferencias a las neuronas GnRHérgicas. En este trabajo fue propuesto como hipótesis que los estrógenos regulan de manera directa a las neuronas GnRHérgicas, modulando la expresión génica de moléculas involucradas en la regulación de la secreción de su hormona. Para analizar esta hipótesis se utilizó el modelo de neuronas GnRHérgicas mencionado, las células GT1-7, en donde se determinó el efecto de 17β -estradiol 10 nM sobre el nivel de expresión de receptores adrenérgicos (RA), kisspeptinérgicos y estrogénicos.

La norepinefrina (NE) fue uno de los primeros neurotransmisores que se encontró involucrado en la regulación del pico preovulatorio de la LH (Sawyer et al., 1947; Sawyer, 1950; Sawyer, 1952). En cuanto a lo observado en las 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). En el presente estudio se detectó en las células GT1-7 la expresión de los nueve RA conocidos, confirmando así la expresión de los RA α 1A, α 1B, α 1D, α 2A, α 2C, y β 1 y reportando por primera vez la expresión de los RA α 2B, β 2 y β 3 en esta

línea celular. Este hallazgo resulta interesante debido a que las tres diferentes familias de RA ($\alpha 1, \alpha 2$ y β) se encuentran acopladas a diferentes vías de transducción, las cuales conllevan a efectos contrarios sobre la secreción hormonal.

Por su parte, se ha estudiado la posible interacción de otros factores reguladores del eje reproductivo sobre la señal adrenérgica que regula este mismo sistema, como lo son las hormonas esteroides, particularmente los estrógenos. 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 de rata, y se ha observado que 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 (Lee, et al., 2000). Por lo que 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 RA 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 RA. 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 de dos RA de la familia $\alpha 1$. Este consiste en un incremento significativo en la expresión del gen correspondiente al RA $\alpha 1B$ a las 6 y 24 h del tratamiento, siendo estos incrementos de 14 y 19 veces respectivamente. En el caso del RA $\alpha 1D$ también se observó un incremento significativo de 23 veces a las 24 h del tratamiento. Estos resultados son acordes con lo observado en otro estudio, donde se demostró que esta misma hormona incrementa la respuesta a la señal adrenérgica mediada por receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos en explantes hipotalámicos de rata, siendo este efecto causado por un incremento en la expresión de los RA $\alpha 1B$ a las 24 y 48 horas del tratamiento estrogénico (Karkanias, et al., 1996). En los RA de las familias $\alpha 2$ y β , aunque no se observaron importantes incrementos, se detectó una tendencia a aumentar entre 2 y 3 veces. Estos resultados

coinciden con otros estudios que muestran este mismo efecto en diversos sistemas tanto *in vivo* como *in vitro*, entre los que se incluyen útero (Hatjis, et al., 1988; Nimmo, et al., 1989; Engstrom, et al., 2001), glándula mamaria (Marchetti y Labrie, 1990), y adipocitos (Monjo, et al., 2003; Pedersen et al., 2004).

Es importante considerar que en el presente estudio únicamente se determinó la expresión génica de los RA a nivel de ARN mensajero, lo cual es un indicio de un posible efecto a nivel de la síntesis proteica, que hasta no ser evaluado directamente no es posible afirmar. En este estudio en particular, es aún más 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 de estas moléculas, el resultado final sobre el eje reproductivo podría ser un aumento en la transmisión sináptica adrenérgica mediada por estos receptores, y por ende en la secreción de la GnRH. 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. Además, es importante considerar que las hormonas esteroides son moléculas capaces de causar diversos efectos en un mismo sistema mediante una gran variedad de mecanismos (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 RA β (Engstrom, et al., 2001). Hay evidencias que indican que esta desensibilización se debe a un desacoplamiento de los RA de sus proteínas G. En explantes hipotalámicos, se ha demostrado que el estradiol estabiliza el estado fosforilado de los receptores adrenérgicos mediante el cual éstos son desacoplados de su proteína G, de tal forma que se inhibe la desfosforilación para un posterior acoplamiento (Ansonoff y Etgen, 2000). 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 otro 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 inhibitor sobre la secreción de la GnRH. Sin embargo, falta considerar la posibilidad de que este efecto final sea modificado en función del tiempo ya que 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).

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 manera hipotética; habría un mecanismo de retroalimentación positiva sobre la secreción de la GnRH 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 tomaría de ser del tipo positivo a ser del tipo negativo, lo cual podría 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 conllevaría 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.

Por otra parte, en el presente estudio se analizó el efecto de la kisspeptina sobre la secreción de GnRH, en las neuronas de la línea celular GT1-7. Como ha sido observado en las neuronas GnRHérgicas *in vivo*, en este trabajo fue detectado el receptor GPR54 en las células GT1-7. También se demostró la funcionalidad de este receptor por su activación con kisspeptina-10, la cual indujo una estimulación en la expresión y secreción de la GnRH, siendo esta última comparable en magnitud con lo

observado en explantes hipotalámicos de rata (Thompson et al., 2004; Nazian, 2006). Este resultado es contradictorio con lo reportado por Nazian (2006), quien trató a las células GT1-7 con kisspeptina-10 a concentraciones de 0.1 nM a 1.0 μ M durante un período de 2.5 h ó 8 h, y al medir los niveles de GnRH secretada al medio mediante radioinmunoensayo, no detectó efecto alguno. Nazian propone que la kisspeptina influencia a las neuronas GnRHérgicas preferentemente de manera indirecta vía interneuronas, en lugar de actuar directamente sobre las neuronas GnRHérgicas. Aquí se considera que la ausencia de activación en las células GT1-7 por kisspeptina que él observó, podría ser atribuida al prolongado período de aplicación del tratamiento. Incluso hay evidencia que muestra que la infusión continua de la kisspeptina desensibiliza al GPR54 (Seminara et al., 2006). En apoyo a nuestros resultados, otros grupos de investigación de manera simultánea reportan la expresión del GPR54 en células GT1-7, e incluso muestran que la kisspeptina activa potenciales de acción en estas células, confirmando así la funcionalidad de este receptor (Li et al., 2007; Quaynor et al., 2007). La detección del GPR54 en estas células sugiere que la señal kisspeptinérgica que estimula la secreción de la GnRH actúa vía directa sobre las neuronas GnRHérgicas. Por otra parte, en este estudio se detectó al ARN mensajero de KiSS-1 en las células GT1-7. Este hallazgo sugiere la existencia de una modulación autócrina de la secreción de la GnRH por este péptido, hipótesis que también propone otro grupo de investigación que también de manera simultánea reportó la secreción de la kisspeptina por las células GT1-7 (Quaynor et al., 2007). Esta coexpresión de kisspeptina y GnRH hasta el momento no ha sido observado *in vivo* en roedores, aunque sí en ovinos donde mediante inmunohistoquímica se detectó una colocalización de la kisspeptina y la GnRH en el área preóptica (Pompolo et al., 2006).

La detección del sistema GPR54/Kisspeptina en las células GT1-7, además de sugerir que la señal kisspeptinérgica actuaría directamente sobre las neuronas GnRHérgicas, nos proporciona un modelo donde se podría continuar el estudio de este sistema más profundamente. Actualmente se considera que el GPR54 es la llave reguladora de la función reproductiva, implicándose de manera importante en el proceso de la pubertad (Seminara et al., 2003). Durante los últimos tres años se ha estudiado la fisiología de la kisspeptina en el contexto de un regulador del eje neuroendócrino, y varias revisiones excelentes han sido publicadas al respecto (Colledge 2004; Seminara y Kaiser 2005; Murphy 2005; Tena-Sempere 2005; Ojeda et al., 2005; Vogel 2005; Popa

et al., 2005; Messenger 2005b; Aparicio 2005; Dungan et al., 2005; Plant 2006; Gottsch et al., 2006; Smith et al., 2006; Kuohung y Kaiser 2006). También se ha demostrado que el sistema GPR54/Kisspeptina, es modulado por estrógenos (Navarro et al 2004; Irwig et al, 2004; Popa et al., 2005; Smith et al, 2005a; Smith et al, 2005b; Shahab et al 2005; Pompolo et al 2006). Esto coincide con los resultados del presente trabajo, en donde al analizar el efecto del 17β -estradiol sobre los niveles de ARN mensajeros correspondientes al GPR54 y KiSS-1 en las células GT1-7, se observó un incremento significativo en ambas moléculas a las 24 horas del tratamiento. Proponemos que los estrógenos actúan directamente sobre las neuronas GnRHérgicas incrementando la expresión génica del GPR54, por lo cual podría aumentar también el número de estos receptores en la membrana celular, haciendo más sensibles a estas células a la kisspeptina. En este caso, el efecto observado podría estar implicado en un mecanismo de retroalimentación positiva. Al comparar este efecto con lo observado *in vivo*, tenemos que *in vivo* a nivel hipotalámico, la señal estrogénica actúa como retroalimentador negativo sobre el sistema GPR54/Kisspeptina (Navarro et al., 2004; Pompolo et al., 2006). Sin embargo, al analizar esta regulación por áreas hipotalámicas se ha encontrado un efecto de retroalimentación tanto de manera negativa como positiva, según el área analizada. En el hipotálamo ventromedial, el estradiol estimula la expresión de KiSS-1, particularmente en el núcleo anteroventral periventricular (AVPV), el cual se ha implicado en el mecanismo de retroalimentación positiva de regulación del pico preovulatorio de LH. En el núcleo arcuato el estradiol disminuye la expresión de este gen, implicándolo así en la retroalimentación negativa (Smith et al., 2005a; Smith et al., 2005b). El incremento observado de los ARN mensajeros de KiSS-1 y GPR54 en respuesta a estradiol en las neuronas GnRHérgicas, el cual es paralelo a la señal estrogénica que induce el pico preovulatorio de LH en el AVPV, sugiere que las células GT1-7 son un modelo válido para analizar el mecanismo molecular de acción del estradiol sobre el AVPV. Este hallazgo muestra que los estrógenos podrían regular de manera directa a las neuronas GnRHérgicas mediante la modulación de su respuesta a señales presinápticas como la kisspeptina, el estimulador de la secreción de la GnRH más recientemente descubierto.

Estos resultados apoyan la propuesta de la existencia de una modulación estrogénica del eje reproductivo por acción directa sobre las neuronas GnRHérgicas. Sin embargo, una reciente investigación propone que la regulación estrogénica del eje

reproductivo, la cual es responsable de inducir la ovulación, es mediada principalmente por el RE α , lo cual ocurriría de manera indirecta ya que este receptor no se ha visto expresado en las neuronas GnRHérgicas *in vivo* (Wintermantel et al., 2006). Por otra parte, se ha discutido la posibilidad de que nuestro modelo de neuronas GnRHérgicas, las células GT1, tenga un carácter más embrionario que de etapa adulta, lo que incluso es una forma en que se ha explicado la presencia del RE α en estas células (Poletti et al., 1994; Shen et al 1998). Es factible que la modulación estrogénica vía acción directa sobre las neuronas GnRHérgicas sea importante en alguna etapa específica del desarrollo, más que durante la adultez. Sería interesante analizar si las modificaciones que ocurren en la expresión de GPR54 y KiSS-1 en respuesta a tratamientos estrogénicos durante etapas donde inicia la pubertad (Navarro et al., 2004), esten mediadas de manera directa, lo cual es sugerido por nuestro hallazgo en las células GT1-7.

Finalmente, la detección en las neuronas GnRHérgicas GT1-7 del RE membranar más recientemente descubierto, el GPR30, es una evidencia más que apoya la hipótesis en la que se propone la existencia de una modulación estrogénica del eje reproductivo por acción directa sobre las neuronas secretoras de la GnRH. Esta proteína transmembranar acoplada a proteínas G que a diferencia de los RE nucleares, presenta una alta selectividad para estradiol y una muy baja afinidad para otros esteroides como estrona y estriol, ha sido de gran interés para los investigadores del área del cáncer, quienes han descrito su importante implicación en el desarrollo de diversos tipos de células y tejidos cancerosos (Vivacqua et al., 2006a; Vivacqua et al., 2006b; Filardo et al., 2006; Albanito et al., 2007). Se ha estudiado profundamente a nivel de vías de transducción de señales, describiéndose la activación de MAPKinasas y adenilato ciclasas en respuesta a estradiol (Filardo et al., 2000; Filardo et al., 2002). Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto a su localización celular, ya que inicialmente se encontró localizado en la membrana celular, lo cual contrasta con un estudio que reporta su localización exclusiva en retículo endoplásmico (ver Prossnitz et al., 2007). La detección de esta molécula en las células GT1-7 proporciona un modelo adicional para el estudio de este nuevo receptor a estrógenos, además de ser el primer estudio en que se propone la implicación de este receptor en la función reproductiva.

En resumen, los presentes hallazgos son consistentes con la noción de que los estrógenos regulan directamente a las neuronas GnRHérgicas mediante la modulación

de su respuesta a señales presinápticas, como la NE y la kisspeptina. Este mecanismo de acción podría ser complementario a la regulación indirecta que implica la modulación de vías transinápticas y gliales. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para determinar la relevancia funcional de este mecanismo en neuronas GnRHérgicas *in situ*, como también para la determinación del tipo de receptores estrogénicos que están mediando estos efectos.

10. CONCLUSIONES

Las neuronas GnRHérgicas de la línea celular GT1-7 expresan a los nueve receptores adrenérgicos conocidos, lo cual muestra una alta complejidad en los mecanismos de respuesta de estas células a la señal adrenérgica.

Las neuronas GnRHérgicas GT1-7 expresan de manera funcional el sistema Kisspeptina/GPR54, lo que muestra que la estimulación de la secreción de la GnRH por Kisspeptina podría ser efectuado por la acción directa de éste péptido sobre las neuronas GnRHérgicas.

Las células GT1-7 expresan el receptor a estrógenos membranal recientemente descubierto, el GPR30. Este hallazgo apoya la existencia de acciones estrogénicas directas sobre las neuronas GnRHérgicas.

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 $\alpha 1B$ y $\alpha 1D$ adrenérgicos, GPR54 y KiSS-1 en las neuronas GnRHérgicas GT1-7. Este efecto podría involucrar un aumento en el flujo de información por las aferencias adrenérgicas y kisspeptinérgicas 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 que induce la ovulación.

11. LITERATURA CONSULTADA

Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M. 2004. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell*. 16(1):231-7.

Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, Ando S, Maggiolini M. 2007. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 67(4):1859-66.

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.

Arreguin-Arevalo JA, Lents CA, Farmerie TA, Nett TM, Clay CM. 2006. KiSS-1 peptide induces release of LH by a direct effect on the hypothalamus of ovariectomized ewes. *Anim Reprod Sci*. 17;

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.

Aparicio SA. 2005. Kisspeptins and GPR54--the new biology of the mammalian GnRH axis. *Cell Metab*.1(5):293-6.

Bernard PS, Wittwer CT. 2002. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 48(8):1178-85.

Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. 2004. Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays Biochem*. 40:105-20. Review.

Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ. 2007. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol*. 193(2):311-21.

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.

Choi S, Kellogg CK. 1992. Norepinephrine utilization in the hypothalamus of the male rat during adolescent development. *Dev Neurosci.* 14(5-6):369-76.

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. *Endocrinology.* 132, 735-743.

Colledge WH. 2004. GPR54 and puberty. *Trends Endocrinol Metab.* 15(9):448-53. Review.

Corbin CJ, Graham-Lorence S, McPhaul M, Mason JI, Mendelson CR, Simpson ER. 1988. Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(23):8948-52.

De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(19):10972-6.

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.

Duax WL, Griffin JF, Weeks CM, Wawrzak Z. 1988. The mechanism of action of steroid antagonists: insights from crystallographic studies. *J Steroid Biochem.* 1988 Oct;31(4B):481-92. Review.

Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. 2006. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology.* 147(3):1154-8.

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. *Endocrinology.* 136, 1603-1609.

Evinger AJ 3rd, Levin ER. 2005. Requirements for estrogen receptor alpha membrane localization and function. *Steroids.* 70(5-7):361-3. Review.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol.* 14(10):1649-60.

Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI. 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol.* 16(1):70-84.

Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, Steinhoff MM, Sabo E. 2006. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 12(21):6359-66.

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. *Endocrinology.* 132, 682-688.

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

Fuqua SA, Wolf DM. 1995. Molecular aspects of estrogen receptor variants in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 35(3):233-41. Review.

Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL. 2003. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun.* 312(4):1357-63.

Gore AC, Terasawa E. 1991. A role for norepinephrine in the control of puberty in the female rhesus monkey, *Macaca mulatta*. *Endocrinology.* 1991 Dec;129(6):3009-17.

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

Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. 2006. Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Mol Cell Endocrinol.* 25;254-255:91-6. Review.

Govind AP, Thampan RV. 2003. Membrane associated estrogen receptors and related proteins: localization at the plasma membrane and the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem.* 253(1-2):233-40. Review.

Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 231(4742):1150-4.

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

Hall JM, Couse JF, Korach KS. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 5;276(40):36869-72. Review.

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

Harms JF, Welch DR, Miele ME. 2003. KISS1 metastasis suppression and emergent pathways. *Clin Exp Metastasis.* 20(1):11-8.

Herbison AE, y Theodosis DT. 1992. Localisation of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystikinin 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. *Endocrinology.* 42, 493.

Hewitt SC, Deroo BJ, Korach KS. 2005. Signal transduction. A new mediator for an old hormone? *Science.* 11;307(5715):1572-3.

Ho KJ, Liao JK. 2002. Non-nuclear Actions of Estrogen: New Targets for Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease. *Mol Interv.* 2(4):219-28.

Horikoshi Y, Matsumoto H, Takatsu Y, Ohtaki T, Kitada C, Usuki S, Fujino M. 2003. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(2):914-9.

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. *Endocrinology.* 142, 3261-3264.

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

Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology.* 80(4):264-72.

Jensen EV, Hurst DJ, DeSombre ER, Jungblut PW. 1967. Sulfhydryl groups and estradiol-receptor interaction. *Science.* 1967 Oct 20;158(799):385-7.

Jensen EV. 1968. Estrogen receptor: ambiguities in the use of this term. *Science*. 159(820):1261.

Jensen EV. 1992. Remembrance: Gregory Pincus--catalyst for early receptor studies. *Endocrinology*. 131(4):1581-2.

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.

Kelly MJ, Levin ER. 2001. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 12(4):152-6. Review.

Kissel JH, Rosenfeld MG, Chase LR, O'Malley BW. 1970. Response of chick oviduct adenyl cyclase to steroid hormones. *Endocrinology*. 86(5):1019-23.

Kobayashi R, Harada A, Kotani M, Yamada T, Wakabayashi K. 1978. An increase of pituitary 3', 5' cyclic adenosine monophosphate produced by estradiol benzoate in vitro: possible implication of this increase in the secretion of luteinizing hormone. *Horm Metab Res*. 10(3):237-42.

Kozlowski GP, Coates PW. 1985. Ependymoneuronal specializations between LHRH fibers and cells of the cerebroventricular system. *Cell Tissue Res*. 1985;242(2):301-11.

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 prolactin. En: Knobil E y Neil JD, (Eds), *The Physiology of Reproduction*. (pp. 1623-1629). New York: Raven Press.

Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*. 14;276(37):34631-6.

Krajewski SJ, Abel TW, Voytko ML, Rance NE. 2003. *J Clin Endocrinol Metab*. 88(2):655-62.

- Kreda SM, Sumner M, Fillo S, Ribeiro CM, Luo GX, Xie W, Daniel KW, Shears S, Collins S, Wetsel WC. 2001. *Endocrinology*. 142(11):4839-51.
- 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.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138(3):863-70.
- Kumar V, Green S, Staub A, Chambon P. 1986. Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *EMBO J*. 5(9):2231-6.
- Kuohung W, Kaiser UB. 2006. GPR54 and KiSS-1: role in the regulation of puberty and reproduction. *Rev Endocr Metab Disord*. 7(4):257-63. Review.
- Langub MC Jr, Watson RE Jr. 1992. Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelia, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology*. 130(1):364-72.
- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*. 4;88(23):1731-7. Erratum in: *J Natl Cancer Inst* 1997 Oct 15;89(20):1549.
- Lee A, Talley E, Rosin DL, Lynch KR. 1995. Characterization of alpha 2A-adrenergic receptors in GT1 neurosecretory cells. *Neuroendocrinology* 62, 215-225.
- Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF. 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett*. 5;446(1):103-7.
- 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. *Neuroendocrinology*. 70, 237-245.
- Lehman MN, y Karsch FJ. 1993. Do gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 133, 887-895.
- Li L, Haynes MP, Bender JR. 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;100(8):4807-12.

Li D, Mitchell D, Luo J, Yi Z, Cho SG, Guo J, Li X, Ning G, Wu X, Liu M. 2007. Estrogen Regulates KiSS1 Gene Expression through Estrogen Receptor {alpha} and SP Protein Complexes. *Endocrinology*. 148(10):4821-8.

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.

Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(23):11162-6.

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. *Endocrinology*. 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. *Endocrinology*. 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. *Endocrinology*. 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. *Neuroendocrinology*. 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.

McInerney EM, Weis KE, Sun J, Mosselman S, Katzenellenbogen BS. 1998. Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology*. 139(11):4513-22.

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. Immortalization of hypothalamic GnRH Neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron*. 5, 1-10.

Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. 2005a. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(5):1761-6.

Messenger S. 2005b. Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty. *J Neuroendocrinol*. 17(10):687-8.

Miller WR, Larionov A. 2004. Aromatase 2004, Edinburgh, UK, 6-8 September 2004. *Breast Cancer Res*. 2;7(1):E2.

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. *J Neuroendocrinol*. 77, 198-207.

Molenda HA, Kilts CP, Allen RL, Tetel MJ. 2003. Nuclear receptor coactivator function in reproductive physiology and behavior. *Biol Reprod*. 69(5):1449-57.

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. *Endocrinology*. 144, 4923-30.

Mortimer CH, Besser GM y McNeilly AS. 1975. En: Motta M, Crosignani PG y Martini L. *Hypothalamic hormones* (pp. 325-336). Londres : Academic Press.

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.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. 1996. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*. 19;392(1):49-53.

Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R,

Philpott KL, Harrison DC. 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 3;276(31):28969-75.

Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, Douglas D, Coutts A, Watson PH. 1997. Estrogen receptor variants and mutations. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 62(5-6):363-72. Review.

Murphy KG. 2005. Kisspeptins: regulators of metastasis and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol.* 17(8):519-25. Review.

Navarro CE, Saeed SA, Murdock C, Martinez-Fuentes AJ, Arora KK, Krsmanovic LZ, Catt KJ. 2003. Regulation of cyclic adenosine 3',5'- monophosphate signaling and pulsatile neurosecretion by Gi-coupled plasma membrane estrogen receptors in immortalized gonadotrophin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol.* 17:1792-1804.

Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. 2004. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology.* 145(10):4565-74.

Nazian SJ. 2006. Role of metastin in the release of gonadotropin-releasing hormone from the hypothalamus of the male rat. *J Androl.* 27(3):444-9.

Negro-Vilar A, Ojeda SR, y McCann SM. 1979. Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals in vitro. *Endocrinology.* 104, 1749-57.

Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 81(4):1535-65. Review.

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.

O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF Jr, George SR. 1998. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics.* 15;47(2):310-3.

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. 1998. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res.* 1;26(15):3505-12.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature.* 31;411(6837):613-7.

Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V, Mungenast AE. 2006. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology*. 147(3):1166-74. Review.

Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC, Ali S. 1997. Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J Biol Chem*. 272(41):25832-8.

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.

Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. 1997. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*. 11(10):1486-96.

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, Karkanas 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.

Plant TM. 2006. The role of KiSS-1 in the regulation of puberty in higher primates. *Eur J Endocrinol*. 155 Suppl 1:S11-6

Popa SM, Clifton DK, Steiner RA. 2005. A KiSS to remember. *Trends Endocrinol Metab*. 16(6):249-50.

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. *Endocrinology*. 135, 2623-8.

Pompolo S, Pereira A, Estrada KM, Clarke IJ. 2006. Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology*. 147(2):804-10.

Quaynor S, Hu L, Leung PK, Feng H, Mores N, Krsmanovic LZ, Catt KJ. 2007. Expression of a functional G protein-coupled receptor 54-kisspeptin autoregulatory system in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol*. 21(12):3062-70.

Radovick S, Ticknor CM, Nakayama Y, Notides AC, Rahman A, Weitraub BD, Cutler Jr GB, 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.
- Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. 2003. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem.* 24;278(4):2701-12.
- 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. *Endocrinology.* 130, 1090-1096.
- Rosenfeld MG, O'Malley BW. 1970. Steroid hormones: effects on adenylyl cyclase activity and adenosine 3',5'-monophosphate in target tissues. *Science.* 10;168(928):253-5.
- 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. *Endocrinology.* 140, 5045-5053.
- Sawyer CH, Markee JE, Hollinshead WH. 1947. Inhibition of ovulation in rabbit by the adrenergic-blocking agent dibenamine. *Endocrinology.* 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.
- Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 23;349(17):1614-27.
- Seminara SB, Kaiser UB. 2005. New gatekeepers of reproduction: GPR54 and its cognate ligand, KiSS-1. *Endocrinology.* 146(4):1686-8.
- Seminara SB, Dipietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF Jr, Plant TM. 2006. Continuous human metastatin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology.* 147(5):2122-6.

Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(6):2129-34.

Shen ES, Meade EH, Pérez MC, Deecher 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. *Endocrinology*. 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.

Silverman RC, Gibson MJ, Silverman AJ. 1991. Relationship of glia to GnRH axonal outgrowth from third ventricular grafts in hpg hosts. *Exp Neurol*. 1991 Dec;114(3):259-74.

Skyner MJ, Sim JA, Herbison AE. 1999. Detection of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 140, 5195-201.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*. 1994 Oct 20;331(16):1056-61. Erratum in: *N Engl J Med* 1995 Jan 12;332(2):131.

Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA. 2005a. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*. 146(7):2976-84.

Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. 2005b. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 146(9):3686-92.

Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. 2006. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction*. 131(4):623-30. Review.

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. *Endocrinology*. 144, 484-90.

Stafford LJ, Xia C, Ma W, Cai Y, Liu M. 2002. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer Res*. 62(19):5399-404.

- Tena-Sempere M. 2005. Hypothalamic KiSS-1: the missing link in gonadotropin feedback control? *Endocrinology*. 146(9):3683-5.
- 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. *Endocrinology*. 123, 1808-16.
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005 Feb;146(2):624-32.
- Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillon WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR. 2004. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol*.16(10):850-8.
- Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES Jr, Nethrapalli IS, Tinnikov AA. 2002. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci*. 1;22(19):8391-401.
- 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. *Endocrinology*. 133(6):2818-26.
- Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, Madeo A, Rago V, Carpino A, Musti AM, Picard D, Ando S, Maggiolini M. 2006a. 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Mol Pharmacol*. (4):1414-23.
- Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Ando S, Maggiolini M. 2006b. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol*. (3):631-46.
- Vogel G. 2005. Reproductive biology. A powerful first KiSS-1. *Science*. 309(5734):551-2.
- Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrase G, Waterfield M, Chambon P. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Dec;82(23):7889-93.
- 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.

Weissman BA, Skolnick P. 1975. Stimulation of Adenosine 3',5'-monophosphate formation in incubated rat hypothalamus by estrogenic compounds: relationship to biologic potency and blockade by anti-estrogens. *Neuroendocrinology*. 18(1):27-34.

Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Grone HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Perez CA, Schutz G, Herbison AE. 2006. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron*. 19;52(2):271-80.

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. *Endocrinology*. 129, 1083-92.

Wurtman RJ. 1968. Estrogen receptor: ambiguities in the use of this term. *Science*. 159(820):1261.

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. *Neurotoxicology*. 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.

12. ANEXO (PUBLICACIÓN)

17-Beta-Estradiol Directly Regulates the Expression of Adrenergic Receptors and Kisspeptin/GPR54 System in GT1-7 GnRH Neurons

Jessica S. Jacobi Cecilia Martin Gabriel Nava Michael C. Jeziorski
Carmen Clapp Gonzalo Martínez de la Escalera

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, Mexico

Key Words

Estradiol · Norepinephrine · Kisspeptin · GPR30 · GPR54 · GT1-7 cells · Gonadotropin-releasing hormone

Abstract

Estradiol plays a critical role in the feedback regulation of reproduction, in part by modulating the neurosecretory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. While indirect effects of estradiol on GnRH neurons have been clearly demonstrated, direct actions are still controversial. In the current study, we examined direct effects of 17 β -estradiol upon the expression of receptors for afferent signals at the level of the GnRH neuron, using immortalized GT1-7 cells. Using RT-PCR, we confirmed the expression of mRNA for the adrenergic receptors (AR) α_1 A-, α_1 B-, α_1 D-, α_2 A-, α_2 C-, and β_1 -AR, and showed for the first time that mRNAs for α_2 B-, β_2 - and β_3 -AR, for kisspeptin and its receptor GPR54 and for the novel estrogenic receptor GPR30 are expressed in GT1-7 cells. After treatment with 10 nM 17 β -estradiol, α_1 B-AR mRNA was significantly increased (14-fold) after 6 h as determined by real-time PCR, while α_1 B- and α_1 D-AR mRNA were significantly increased (19- and 23-fold, respectively) after 24 h. The expression of KiSS-1 and GPR54 mRNAs were also significantly increased (8- and 6-fold, respectively) after 24 h treatment of GT1-7 cells with

estradiol. GPR30 mRNA expression was not affected by estradiol. Our data also showed that kisspeptin-10 (1–10 nM) can significantly stimulate GnRH release and GnRH mRNA expression in GT1-7 cells. These results suggest that the complex physiologic effects of estradiol on the function of the reproductive axis could be mediated partly through direct modulation of the expression of receptors for afferent signals in GnRH neurons.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

Introduction

Reproduction is regulated by a complex interaction of neural and hormonal signals that converge on hypothalamic neurons responsible for the pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). One of the most important signals is supplied by the feedback mechanisms from gonadal steroids. The concept of steroid feedback was initially postulated in the 1930s. Nevertheless, how and where steroid hormones act in order to exert their positive and negative feedback effects are still controversial issues in the neuroendocrinology of reproduction [reviewed in 1–3]. One of these unresolved matters is the specific neuroanatomical locus where estradiol acts upon the GnRH neuroendocrine system, i.e. wheth-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2007 S. Karger AG, Basel
0028-3835/07/0864-0260\$23.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/nen

Gonzalo Martínez de la Escalera
Departamento de Neurobiología Celular y Molecular
Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México
Campus Juriquilla, Querétaro 76230 (Mexico)
Tel. +52 442 238 1029, Fax +52 442 238 1005, E-Mail gmel@servidor.unam.mx

er it involves a direct action upon GnRH neurons, or an indirect action via other neurons that affect GnRH neurons in a transsynaptic fashion or via glial cells, or a combination of the three. Ever since Shivers et al. [4] reported that the vast majority of GnRH cells in the rat brain are not themselves estradiol-concentrating neurons, very few GnRH neurons have been found to be immunocytochemically positive for the estrogen receptor (ER α was the only ER known at that time) in rats [5], guinea pigs [6], ewes [7] and rhesus monkeys [8]. Thus, a consensus view was shaped that the influence of estradiol upon the GnRH system is mediated by cells afferent to GnRH neurons. Indeed, multiple neurotransmitter/neuropeptide systems synapsing on GnRH cell bodies and terminals contain immunoreactive ER α , including GABAergic cells in the preoptic area [9], and β -endorphin- [7, 10] and tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells [7, 11] in the medial basal hypothalamus. The discovery of a second nuclear ER (ER β) [12], and the demonstration that ERs are expressed by immortalized GnRH neurons of the GT1 and GN lineages [13–17], as well as the functional expression of ER β in GnRH neurons in situ [18, 19], have challenged the dogma that GnRH neurons are regulated only indirectly by estradiol, and indicated a need to re-examine the possibility that estradiol may exert its influence, at least in part, directly upon GnRH neurons.

In order to test the hypothesis that estradiol directly affects GnRH neuronal function, we used immortalized GnRH-secreting GT1-7 hypothalamic cells. GnRH neurons in situ are few and scattered throughout the preoptic area/medial basal hypothalamus, making molecular and biochemical analyses difficult. These problems are overcome by GT1-7 cells [20], which constitute a homogeneous population that allows the study of direct effects. GT1 cells have been extensively and successfully used to investigate the regulatory mechanisms intrinsic to GnRH neurons, as well as the extrinsic regulatory mechanisms triggered by neuromediators produced by afferent inputs to GnRH neurons, by growth factors of glial origin, by steroid hormones involved in feedback loops, and by other factors that regulate GnRH gene expression and hormone secretion [21, 22]. Although caution should be exercised when extrapolating from an immortalized cell line to GnRH cells in vivo, GT1 cells offer a unique opportunity to examine gene and protein expression in a defined cell population. Taking advantage of this model, the present study was conducted to determine if estradiol can act directly on GnRH neurons of the GT1 lineage to alter the expression of receptors for afferent signals known to play a pivotal role regulating fertility. For that purpose

we determined and quantified the expression of G-protein-coupled receptors (GPCRs) for synaptic afferent signals, such as the family of adrenergic receptors (AR) and GPR54 (G-protein-coupled receptor 54), the receptor for kisspeptin, as well as a receptor for endocrine signals, GPR30 (G-protein-coupled receptor 30), a recently discovered membrane estrogenic receptor [23–25].

In order to test the hypothesis that estradiol modulates the expression of afferent receptors in GnRH neurons, we chose some of the best-characterized afferent signals and some of the newly discovered but highly relevant physiological regulators of reproduction. Norepinephrine (NE) was one of the first neurotransmitters found to modulate the LH preovulatory surge [26, 27]. Kisspeptin, the peptide product of the KiSS-1 gene and the endogenous agonist for the GRP54 receptor, has recently been shown to be vital to reproductive axis function, since GPR54 mutations can result in hypogonadotropic hypogonadism in humans [28, 29], while GPR54-knockout mice show abnormal sexual development, low circulating gonadotropin concentrations, and infertility [29, 30].

Here we report that in GT1-7 cells estradiol modulates the expression levels of adrenergic and kisspeptinergic receptors. We also found that GnRHergic GT1-7 cells express the KiSS-1 gene itself and that this expression is also modulated by estradiol. Furthermore, we observed that GnRH expression in and secretion from GT1-7 cells is stimulated by the decapeptide kisspeptin-10, a truncated form of the KiSS-1 peptide containing the minimum sequence necessary for receptor activation. Finally, we demonstrate for the first time that GPR30 is expressed in immortalized GnRH neurons. Together, these findings underscore the need to reassess the role of ERs in the direct genomic and potential non-transcriptional actions of estradiol upon the GnRH neuron.

Materials and Methods

Reagents

Kisspeptin-10 was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). 17 β -Estradiol was purchased from Research Biochemical (Natick, Mass., USA).

Cell Culture

GT1-7 cells (kindly provided by R.I. Weiner, University of California, San Francisco, Calif., USA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin/streptomycin. Cells were cultured directly on 100-mm plastic Petri dishes (Costar Corp., Cambridge, Mass., USA) and maintained at 37°C in a water-saturated atmosphere of 95% air and 5% CO₂ until they reached 60–80% confluence. To

determine the effect of estrogen on gene expression, the cells were exposed to 10 nM 17 β -estradiol or vehicle (0.001% ethanol) for 3, 6, 12 or 24 h. 48 h prior to estrogen treatment, the medium was replaced by defined medium (Opti-MEM, Gibco-BRL, Rockville, Md., USA) without serum. For quantification of GnRH release, 4 \times 10⁶ cells were cultured in 60-mm plastic Petri dishes and incubated for 30 min in 0, 1, 10 or 100 nM kisspeptin-10. The medium was collected, lyophilized, and stored at -80°C until assayed. To examine effects of kisspeptin-10 on GnRH mRNA expression, cultures were treated with a single application of 10 nM kisspeptin or with 12 applications of 10 nM kisspeptin, one every 30 min, and cells were harvested 24 h after the initiation of treatment.

Isolation of RNA, Reverse Transcription, and PCR

Total RNA was isolated from GT1-7 cells according to the method of Chomczynski and Sacchi [31]. All samples were treated with deoxyribonuclease I (DNA-free, Ambion, Austin, Tex., USA) following extraction. First-strand cDNA was synthesized using 5 μ g of total RNA as template in 25- μ l reactions containing 2.5 μ M oligo-dT and 100 units of M-MLV reverse transcriptase (Promega Biotech, Madison, Wisc., USA). PCR amplifications were performed in a final volume of 20 μ l containing 0.4 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 1.5 mM MgCl₂, 1 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA), and 0.4 μ M of each specific primer. Single-stranded oligodeoxynucleotide primers used for amplification of each receptor were designed from the murine sequence, and the estimated sizes of each product are shown in table 1. Mouse brain was used as a positive control for these reactions. The negative controls for the PCR included reactions run without template or with GT1-7 cell RNA that had not been subjected to first-strand synthesis. The reaction conditions consisted of an initial denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 60–63°C for 30 s, and 72°C for 45 s, and finally extension for 7 min at 72°C. The products obtained were separated by agarose gel electrophoresis stained with SYBR Gold (Invitrogen), and sequenced using an ABI Prism 310 Genetic Analyzer with dye-terminator cycle.

Real-Time RT-PCR

The LightCycler™ (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind., USA) was used for real-time quantitative analysis of several mRNAs detected in GT1-7 cells. The sample cDNA prepared as above was used as template for the PCR. During PCR, the amplified products were detected after each annealing phase in real time using SYBR® Green Taq ReadyMix™ for Quantitative PCR, Capillary Formulation (Sigma, St. Louis, Mo., USA). Each reaction included 1 μ l of sample cDNA, 200 nM antisense and sense primers, and 6 μ l of SYBR® Green Taq ReadyMix™ in a total reaction volume of 12 μ l. Reaction conditions were 95°C for 30 s for one cycle (hot start), followed by 40 cycles of 95°C for 1 s, 60–63°C for 8 s and 72°C for 20 s. Results were analyzed by the $\Delta\Delta C$ method, which gave a relative quantification [32]. β -Actin was quantified as a reference gene, using sense (5'-CCATCATGAAGTGTGACGTTG-3') and antisense (5'-ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA-3') primers that yielded a reaction product of approximately 173 bp. The expression of β -actin was not altered by estrogen treatment (data not shown). Reaction conditions for each molecule were optimized separately to give the best results for each primer pair. We confirmed PCR specificity by melting

Table 1. Specific oligonucleotide primers designed for PCR

Target	Sequences (5'–3')	Size, bp
α_1 A-AR	fw: TCTTCCATGCCCCAGGGAT rw: CTAGACTTCCTCCCCGTTTTTCACC	201
α_1 B-AR	fw: AGTAGCCCAGCCAGAACAATA rw: GAAGGAAATGTCCAACCTCAA	289
α_1 D-AR	fw: TTGGGCCGCTACAGAGACC rw: TTTGGATCCGAAGGCAGAATC	296
α_2 A-AR	fw: GTGTTACCTCCCCTTGCTGT rw: TGTAACACGAAGTCTCCGC	88
α_2 B-AR	fw: CTGTTGGCTTACAGGTGGCT rw: AGGACAAATGTGCTGTTCCC	165
α_2 C-AR	fw: GCCTGTGCTATCTCTCCTCC rw: AACCACACCAAGAAAGGAGC	113
β_1 -AR	fw: GAGCTCTGGACTTCGGTAGATG rw: GCAGCTGTCGATCTTCTTTACC	390
β_2 -AR	fw: TGGTCATCCTGATGGTATGG rw: CCGGGAATAGACAAAGACCA	242
β_3 -AR	fw: CCGTGGCCTCACAGAAAC rw: CCCATGGTACTCCTGGCAAC	184
GPR54	fw: CTGCCACAGACGTCACCTTTC rw: ACATACCAGCGGTCCACACT	176
KISS-1	fw: AGCTGCTGCTTCTCCTCTGT rw: AGGCTTGCTCTCTGCATACC	140
GPR30	fw: TAACAGAGCAGCGATCTGGA rw: GTGTGAGTGTGAGGCTTGG	153

curve analysis to ensure the presence of only one product, by gel electrophoresis to verify its molecular weight, and by sequencing.

GnRH Enzyme Immunoassay

GnRH in the culture medium was determined by a competitive Enzyme Immunoassay kit (Peninsula Laboratories, San Carlos, Calif., USA). Lyophilized samples and standard peptide were rehydrated in enzyme immunoassay (EIA) buffer and incubated in 0.5 vol of primary antiserum and biotinylated GnRH peptide for 2 h at room temperature in a 96-well Immunoplate specifically designed to bind primary antibody. The wells were washed 5 times with EIA buffer, streptavidin-conjugated horseradish peroxidase was added, and the wells were incubated for 60 min at room temperature. The Immunoplate was washed 5 times with EIA buffer, 100 μ l of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride was added, and the Immunoplate was incubated for 15 min. The reaction was stopped by adding 2 N HCl, and the absorbance of the reaction product was measured at 450 nm in a Spectramax plate reader. A standard curve was then constructed from which quantification of the unknown samples was made. All samples

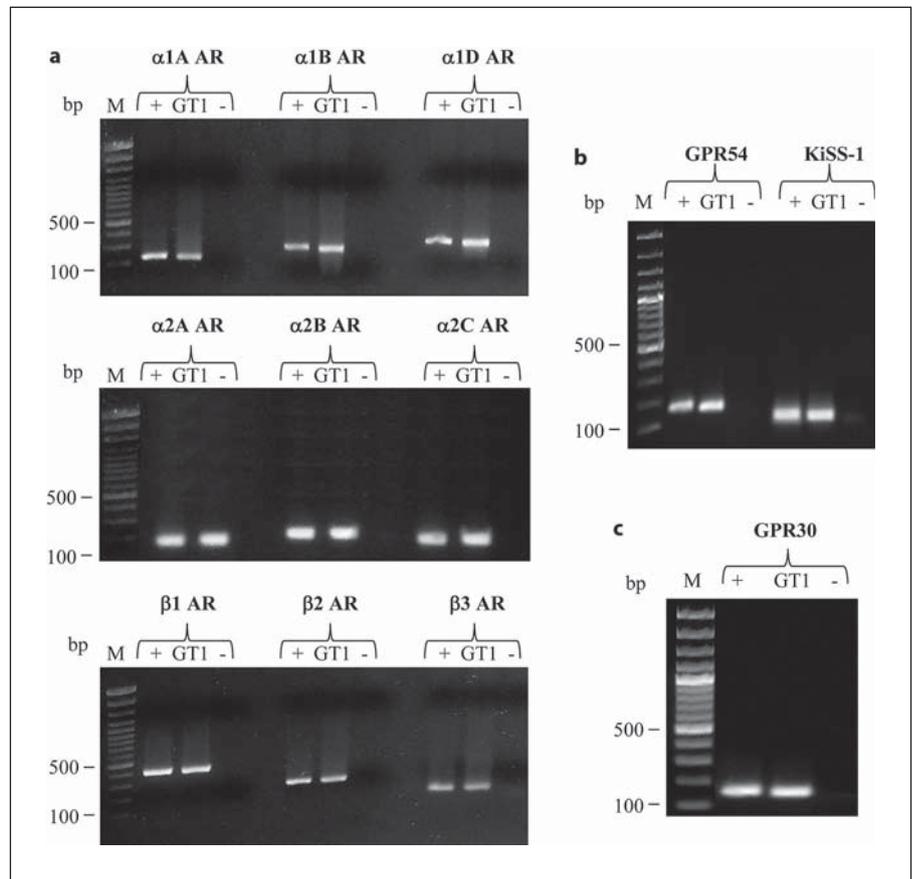


Fig. 1. GT1-7 cells express α_1A -, α_1B -, α_1D -, α_2A -, α_2B -, α_2C -, β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenergic receptors (a), GPR54 and KiSS-1 (b), and GPR30 (c). Representative RT-PCR amplification of the nine adrenergic receptors (AR), GPR54, KiSS-1 and GPR30 performed on extracts from GT1-7 cells (GT1), mouse brain as a positive control (+) and negative control without RT (-). M = DNA molecular markers.

from an experiment were analyzed in the same assay. The range of detection was 0.016–25 ng/ml.

Data Analysis

The data obtained in these studies are illustrated as mean \pm SEM. Data were evaluated and significance determined by a one-way analysis of variance followed by the Bonferroni method for multigroup comparisons.

Results

Expression of AR, GPR54 and KiSS-1, and GPR30 in GT1-7 Cells

RT-PCR analysis was performed for the nine known mouse AR, for mouse GPR54 and KiSS-1, and for mouse GPR30, each of which amplified a single product of the expected size from cDNA derived from a mouse brain control (table 1). Using identical reaction conditions, we found that GT1-7 cells showed readily detectable levels of all of the nine AR transcripts (α_1A , α_1B , α_1D , α_2A , α_2B , α_2C , β_1 , β_2 , and β_3), GPR54, KiSS-1 and GPR30 (fig. 1). The identity of the amplified products was verified by

DNA sequencing. As anticipated, no products could be visualized from the negative control sample that contained only RNA.

Effect of 17 β -Estradiol on mRNA Levels of AR, GPR54 and KiSS-1, and GPR30 in GT1-7 Cells

Real-time PCR was employed to analyze the effect of 17 β -estradiol on the expression level of the GPCRs detected in GT1-7 cells. Data were analyzed by the $\Delta\Delta C$ method, which provides a relative quantification. GT1-7 cells were treated with 17 β -estradiol (10 nM) for 3, 6, 12 or 24 h. Estradiol significantly increased (14-fold) α_1B -adrenoreceptor mRNA expression in GT1-7 cells after 6 h and again after 24 h (19-fold) (fig. 2b). Estradiol also significantly increased (23-fold) α_1D -adrenoreceptor mRNA expression in GT1-7 cells, after 24 h of treatment (fig. 2c). Treatment of GT1-7 cells with estradiol showed a tendency to upregulate α_1A -, α_2A -, α_2B -, α_2C -, β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoreceptor mRNA expression, but this was not statistically significant (fig. 2a, 3, 4).

Furthermore, estradiol caused a significant 6-fold increase in GPR54 mRNA expression (fig. 5a) and 8-fold

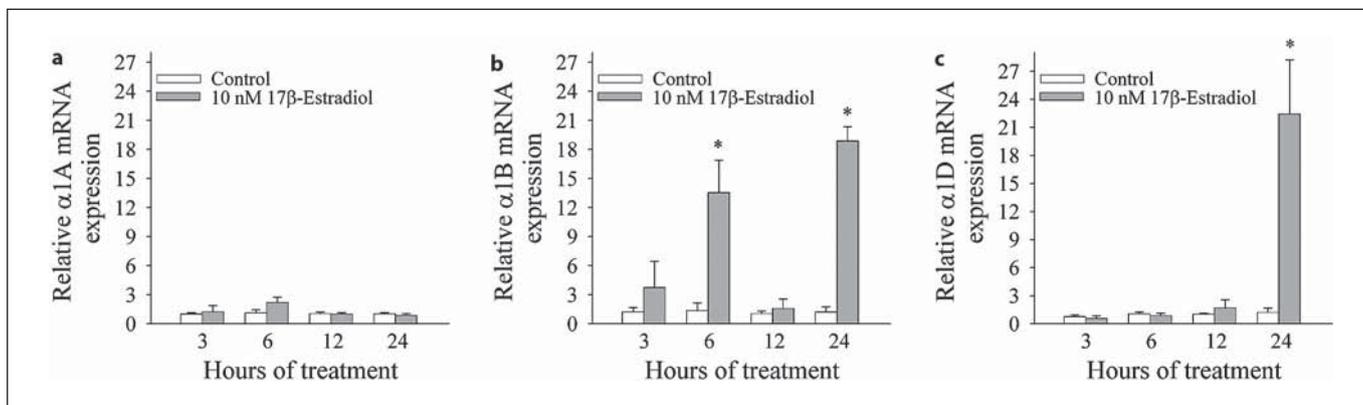


Fig. 2. Effect of 10 nM 17 β -estradiol on α_1A -AR (a), α_1B -AR (b), and α_1D -AR (c) mRNA expression in GT1-7 cells. Total RNA was extracted from GT1-7 cells and used for reverse transcription and quantitative analysis with real-time PCR and SYBR[®] Green I detection. Data were analyzed by the $\Delta\Delta C$ method and expressed relative to the respective control group. Bars represent the mean \pm SEM of three independent experiments. * Significantly different from control group.

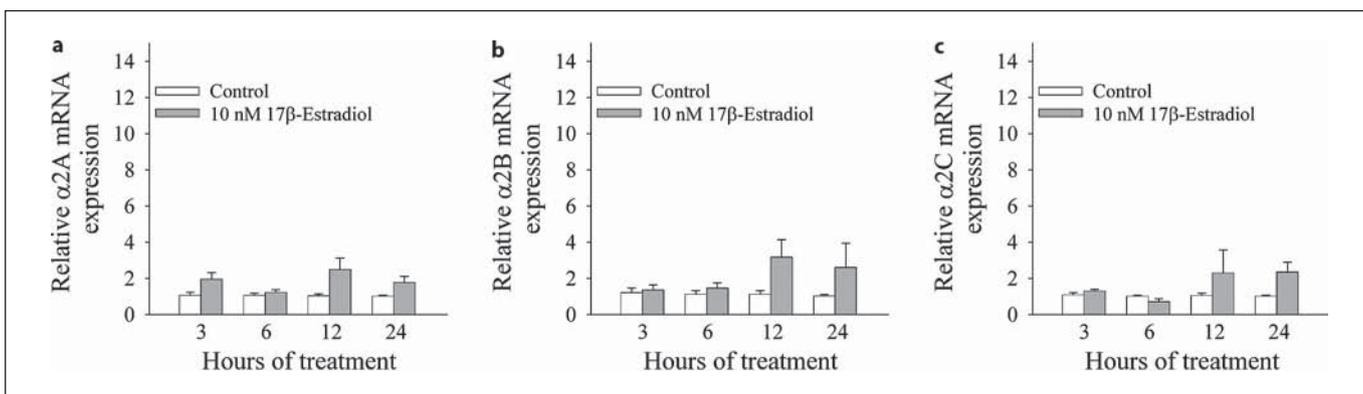


Fig. 3. Effect of 10 nM 17 β -estradiol on α_2A -AR (a), α_2B -AR (b), and α_2C -AR (c) mRNA expression in GT1-7 cells. Total RNA was extracted from GT1-7 cells and analyzed as described in figure 2.

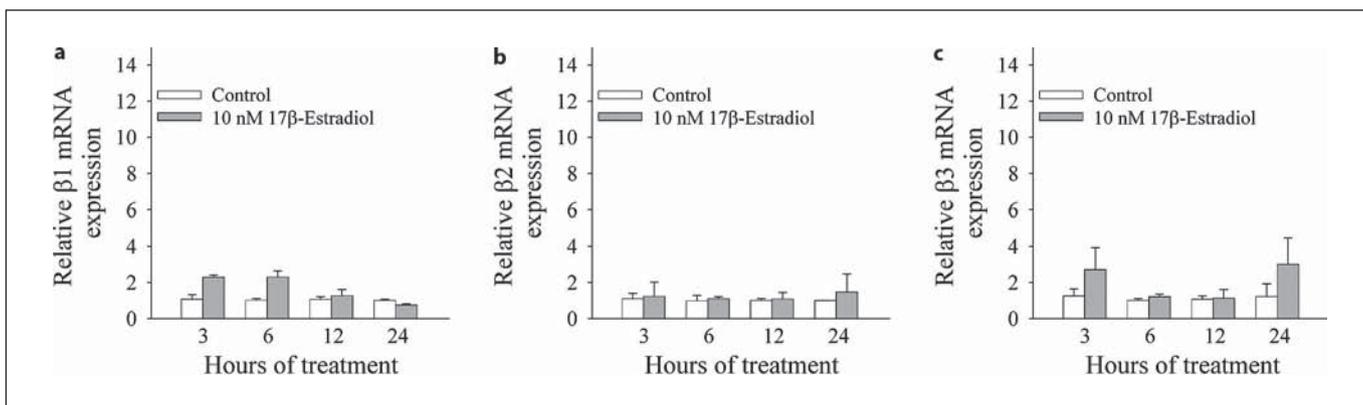


Fig. 4. Effect of 10 nM 17 β -estradiol on β_1 -AR (a), β_2 -AR (b) and β_3 -AR (c) mRNA expression in GT1-7 cells. Total RNA was extracted from GT1-7 cells and analyzed as described in figure 2.

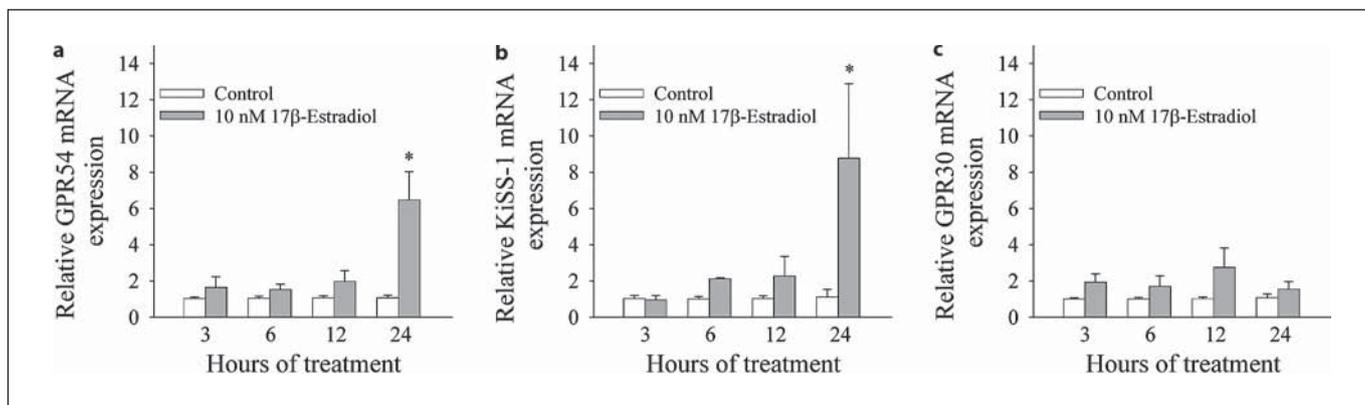
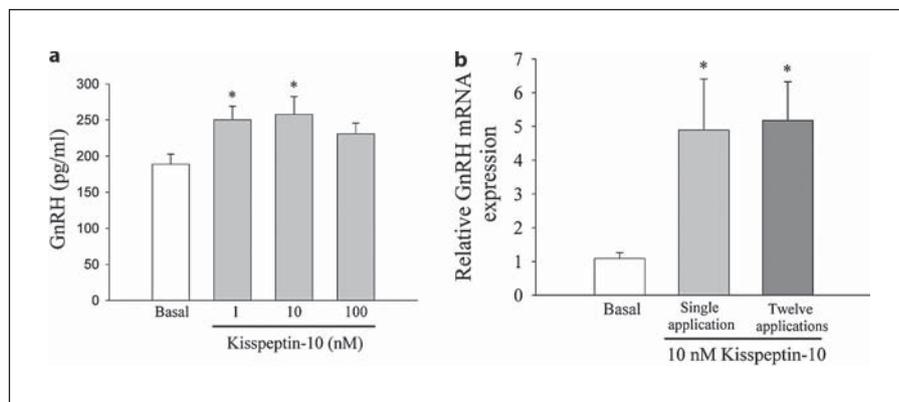


Fig. 5. Effect of 10 nM 17 β -estradiol on GPR54 (a), KiSS-1 (b) and GPR30 (c) mRNA expression in GT1-7 cells. Total RNA was extracted from GT1-7 cells and analyzed as described in figure 2. * Significantly different from control group.

Fig. 6. Effect of kisspeptin-10 on GnRH secretion (a) and GnRH mRNA expression (b) in GT1-7 cells. **a** GT1-7 cells were incubated with 0, 1, 10 or 100 nM human kisspeptin-10 for 30 min. GnRH levels in the medium were determined by EIA. **b** GT1-7 cells were subjected to one application of 10 nM human kisspeptin-10 or twelve applications, one every 30 min, and 24 h later total RNA was extracted and analyzed as described in figure 2. Each column represents the mean \pm SEM of three independent determinations. * Significantly different from control group.



increase in KiSS-1 mRNA expression (fig. 5b) in GT1-7 cells after 24 h of treatment. However, the expression of GPR30 mRNA was not significantly affected by the treatment of GT1-7 cells with estradiol (fig. 5c).

Assessment of the Ability of Kisspeptin-10 to Directly Affect GnRH Release and GnRH mRNA Levels in GT1-7 Cells

In order to address whether GPR54 receptors expressed in GT1-7 cells are functionally coupled, we treated GT1-7 cells in static culture with kisspeptin-10 and tested for the release of GnRH. Kisspeptin-10 exerted a bell-shaped stimulatory effect on GnRH secretion from GT1-7 cells. Kisspeptin significantly stimulated GnRH release after 30 min at concentrations of 1 and 10 nM but had no significant effect at 100 nM (fig. 6a). In addition,

10 nM kisspeptin-10 also upregulated GnRH mRNA levels in GT1-7 cells (fig. 6b). The effect was similar in magnitude 24 h after a single application and after 12 applications (one every 30 min).

Discussion

In the present study, we provide evidence consistent with the concept that GnRH neurons are directly regulated by estradiol. We found that immortalized GnRH neurons of the GT1-7 cell line respond to estradiol by modulating the expression of various receptor mRNAs. Estradiol upregulated the expression of the α_1 subfamily of adrenoceptors after 6 and 24 h of treatment, and upregulated the expression of GPR54 and KiSS-1 after 24 h.

GnRH secretion and expression were increased by challenging GT1-7 cells with kisspeptin-10. The results presented here also demonstrate the expression of the plasma membrane estrogenic receptor GPR30 in these hypothalamic-derived cells. These observations indicate that estradiol can modulate the expression of certain genes in GnRH-producing cells, particularly genes that play a fundamental role in the response of these cells to afferent regulators.

Estradiol is one of the most important modulators of GnRH neuronal activity [1]. It exerts a number of effects on the development and function of these cells, including negative feedback actions on GnRH gene expression [16, 33] and both negative and positive feedback actions on GnRH secretion [34–37]. However, despite the clear role of estradiol in determining GnRH neuronal phenotype, the mechanisms of action involved remain unclear. Evidence gained during the 1980s and 1990s has indicated that only a very small number of GnRH neurons possess ERs (these studies analyzed the presence of ER α , the only ER known at that time), and the research efforts were based on the hypothesis that afferent neurons communicate estradiol signals to GnRH neurons via synaptic contacts. Over the years, these efforts identified numerous brain regions, afferent neurotransmitters, and neuromodulatory systems that are regulated by estradiol and are important for the surge of GnRH [reviewed in 1, 38, 39]. The direct action of estradiol on GnRH neurons was not the focus of many research groups, and so research on this aspect lagged behind. However, in recent years the concept that some of the effects of estradiol may be exerted, at least in part, via direct actions on GnRH neurons has started to gain acceptance. Several findings point in this direction, including the discovery that the human GnRH gene contains an estrogen response element [14, 40] and the demonstration of specific high affinity binding sites for estradiol in immortalized GnRH neurons of the GT1 and GN lines [13, 14]. GT1 cells have also been shown to express mRNA encoding ER α [15, 16] and ER β [16] and both ER α and ER β proteins [16, 41] with a predominance of the latter [42]. In accordance with these observations in GT1 cells, several groups showed the expression of ER β mRNA and protein in mouse and rat GnRH neurons in situ [18, 19, 42, 43]. These receptors appear to be functional, since estradiol increased the phosphorylation of CREB (cAMP response element-binding protein) in GnRH neurons from wild-type mice but not ER β -knockout mice [44]. This finding is consonant with previous evidence showing that estradiol directly affects both the electrical excitability of GnRH cells [45] and the

NE-induced accumulation of cAMP in GT1 cells [46], suggesting that activation of ER in GnRH neurons may alter the responsiveness of these cells to afferent stimuli.

Here we show that estradiol directly alters the expression of receptors for some very important afferent stimulatory inputs to GnRH neurons. NE was one of the first neurotransmitters found to be involved in the modulation of the LH preovulatory surge [26, 27]. There is morphological evidence in rats of GnRH neurons receiving noradrenergic afferents, where synaptic contacts have been demonstrated with electron microscopy [47, 48]. In addition, intraventricular infusion of NE rapidly increases GnRH mRNA [49]. These data and other studies reinforce the notion that the noradrenergic system is fundamental to the regulation of GnRH cells by ovarian steroids [50, 51]. This regulation appears to involve α_1 -AR [52–54]. GT1-7 cells were previously shown to express some members of the α_1 - [55], α_2 - [56], and β_1 -subfamilies [57–59] of adrenoceptors. Here we show that estradiol upregulates the expression of α_1 -AR, but not α_2 - or β -AR. The expression of two members of the α_1 subfamily of AR was enhanced after 6 h (α_{1B}) and 24 h (α_{1B} and α_{1D}) of estradiol treatment. This is consistent with prior observations that estradiol increased α_{1B} -noradrenergic receptor expression and function within the preoptic area (POA) and the hypothalamus of the rat [60, 61], while an α_1 -antagonist blocked the estrogen-induced increase in GnRH mRNA [49]. The lack of estradiol effect on α_2A -adrenoceptor mRNA is consistent with previous observations of a lack of effect in the female rat hypothalamus and POA [62].

Here we show that GT1-7 cells express GPR54 mRNA and KiSS-1 mRNA, thereby suggesting that the kisspeptin/GPR54 signaling system may play an autocrine function in GnRH neurons. In this respect, it has been shown that kisspeptin and GnRH colocalize in the POA of the ovine brain [63]. However, colocalization of kisspeptin and GnRH was not found in the rat [63]. The presence of KiSS-1 in GT1 cells may be due to the fact that GT1 cells might resemble GnRH neurons in early developmental stages (rather than adult neurons), in which kisspeptin might also be present physiologically. Alternatively, it may be the product of their tumoral origin. In any case, the physiological relevance of kisspeptin as an autocrine factor in GnRH neurons in the rodent remains to be determined using more physiological models. GPR54 is vital for the integrity of the reproductive axis, as shown in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and in knockout mice [28–30]. Moreover, GPR54 is expressed in hypothalamic GnRH neurons in

fish [64], mouse [65], and rat [66], and the central administration of kisspeptins to female rats induces precocious puberty [67]. Kisspeptins are known to activate the majority of GnRH neurons in the rat [66, 68], to increase GnRH concentrations in cerebrospinal fluid in sheep [65], and to stimulate GnRH release from hypothalamic explants [69]. The present findings that GT1-7 cells express GPR54 mRNA and that kisspeptin-10 stimulates both GnRH mRNA expression in and GnRH secretion from GT1-7 cells, in addition to the fact that the stimulation of GnRH secretion is comparable in magnitude to that observed in hypothalamic explants of the rat [69, 70], suggests that the GPR54 receptors expressed in GT1-7 cells are functional. Even though it was clear that GPR54 was present at the level of the GnRH neurons and/or on neurons regulating GnRH neurons, the present results are the first to demonstrate that kisspeptin-driven GPR54 signaling acts as a direct releasing mechanism for GnRH. Nazian [70], using two GnRH cell models including GT1-7 cells, reported that kisspeptin-10, while increasing GnRH secretion from male rat hypothalamic fragments, did not affect GnRH secretion from GT1-7 cells. Although the reasons for the discrepancy between the two studies are not known, the use of a different time frame may be important. Whereas we used short-term challenges (30 min) with 1–100 nM kisspeptin-10, Nazian [70] used longer-term (2.5 and 24 h) treatments with 0.1 nM–1 μ M kisspeptin-10. Longer exposures to the peptide may have obscured a relatively rapid response that was followed by degradation of kisspeptin in the culture medium and/or desensitization of GPR54 [71].

Estradiol upregulated both GPR54 and KiSS-1 mRNA expression after 24 h. The fact that estradiol acts directly on GnRH neurons to modulate the expression of the kisspeptin-GPR54 signaling pathway adds to the complexity of a system that is pivotal for initiating puberty and gonadotropin release. Sex steroids in general, and estradiol in particular, have been shown to regulate KiSS-1 mRNA differentially in various nuclear groups in the forebrain that have major physiological implications. While estradiol promotes KiSS-1 expression in the ventromedial hypothalamus, particularly in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV), which is implicated in the positive feedback regulation of the LH surge in the female, it decreases KiSS-1 expression in the arcuate nucleus, implicated in the negative feedback regulation of GnRH in the female mouse [72]. The increases of KiSS-1 and GPR54 mRNA expression in response to estradiol in GnRH neurons that parallel the increase in the AVPV may contribute to the preovulatory LH surge, and suggest

that GT1-7 cells are a valuable model to analyze the molecular mechanism of action of estradiol in the AVPV.

Here we also demonstrate that GT1-7 cells express the seven transmembrane-domain estrogen receptor GPR30. This recently characterized GPCR, identified in plasma membranes of SKBR3 breast cancer cells [73], was previously shown to induce adenylyl cyclase and MAPK activation in MCF-7 breast cancer cells, involving G $\beta\gamma$ -subunits and downstream activation of a Src-related tyrosine kinase [74, 75]. GPR30 was also shown to mediate the increase in *c-fos* expression elicited by estradiol in breast cancer cells [76]. An independent group reported that GPR30 activation by estrogen led to intracellular calcium mobilization and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate accumulation in the nucleus of COS7 cells [77]. However, in contrast to previous studies that had observed GPR30 localized to the plasma membrane, they reported that GPR30 was found exclusively in the endoplasmic reticulum. The controversy of GPR30 localization, the mechanisms of action triggered by its activation, and even the clarification of transcriptional vs. non-genomic estrogen-elicited functions require further studies that may take advantage of GT1-7 cells expressing endogenous GPR30.

In summary, the present findings are consistent with the notion that estrogen directly regulates GnRH neurons by modulating their response to presynaptic signals, including NE and kisspeptin. This site of action may be complementary to estrogen effects involving transsynaptic and glial pathways. Caution is necessary, however, since even though GT1 cells resemble hypothalamic GnRH neurons in their pulsatile secretory behavior and responsiveness to a number of regulatory factors [21, 22], they constitutively express the simian virus-40 T-antigen oncogene. Thus, further studies are necessary to determine the functional relevance of this mechanism in GnRH neurons in situ, and how classical and membrane estrogen receptors such as GPR30 participate in these effects.

Acknowledgements

We thank Fernando López-Barrera, Antonio Prado, Daniel Mondragón and Anaid Antaramián for their expert technical assistance, and Dorothy D. Pless and Stéphanie Thebault for editing the manuscript.

References

- 1 Herbison AE: Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 1998;19:302–330.
- 2 Herbison AE, Pape JR: New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:292–308.
- 3 Petersen SL, Ottem EN, Carpenter CD: Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod* 2003;69:1771–1778.
- 4 Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW: Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 1983;304:345–347.
- 5 Herbison AE, Theodosis DT: 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* 1992;50:283–298.
- 6 Watson RE Jr, Langub MC Jr, Landis JW: Further evidence that most luteinizing hormone-releasing hormone neurons are not directly estrogen-responsive: simultaneous localization of luteinizing hormone-releasing hormone and estrogen receptor immunoreactivity in the guinea-pig brain. *J Neuroendocrinol* 1992;4:311–317.
- 7 Lehman MN, Karsch FJ: Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and β -endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology* 1993;133:887–895.
- 8 Sullivan KA, Witkin JW, Ferin M, Silverman AJ: Gonadotropin-releasing hormone neurons in the rhesus macaque are not immunoreactive for the estrogen receptor. *Brain Res* 1995;363:461–474.
- 9 Flugge G, Oertel WH, Wuttke W: Evidence for estrogen-receptive GABAergic neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area of the rat brain. *Neuroendocrinology* 1986;43:1–5.
- 10 Morrell JI, McGinty JF, Pfaff DW: A subset of β -endorphin- or dynorphin-containing neurons in the medial basal hypothalamus accumulates estradiol. *Neuroendocrinology* 1985;41:417–426.
- 11 Sar M: Estradiol is concentrated in tyrosine hydroxylase-containing neurons of the hypothalamus. *Science* 1984;223:938–940.
- 12 Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA: Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;11:5925–5930.
- 13 Poletti A, Melcangi RC, Negri-Cesi P, Maggi R, Martini L: Steroid binding and metabolism in the luteinizing hormone-releasing hormone-producing neuronal cell line GT1-1. *Endocrinology* 1994;135:2623–2628.
- 14 Radovick S, Wray S, Muglia L, Westphal H, Olsen B, Smith E, Patriquin E, Wondisford FE: Steroid hormone regulation and tissue-specific expression of the human GnRH gene in cell culture and transgenic animals. *Horm Behav* 1994;28:520–529.
- 15 Shen ES, Meade EH, Pérez MC, Deecher DC, Negro-Vilar A, López FJ: Expression of functional estrogen receptors and galanin messenger ribonucleic acid in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons: estrogenic control of galanin gene expression. *Endocrinology* 1998;139:939–948.
- 16 Roy D, Angelini NL, Belsham DD: Estrogen directly represses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor- α (ER α)- and ER β -expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology* 1999;140:5045–5053.
- 17 Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kallo M, Goubillon ML, Coen CW: Oestrogen receptor β -immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol* 2001;13:741–748.
- 18 Skynner MJ, Sim JA, Herbison AE: Detection of estrogen receptor α and β messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 1999;140:5195–5201.
- 19 Hrabovszky E, Steinhäuser A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z: Estrogen receptor- β immunoreactive in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 2001;142:3261–3264.
- 20 Mellon PL, Windle J, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI: Immortalization of hypothalamic GnRH Neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 1990;5:1–10.
- 21 Weiner RI, Wetsel W, Goldsmith P, Martinez de la Escalera G, Windle J, Padula C, Choi A, Negro-Vilar A, Mellon P: Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Front Neuroendocrinol* 1992;13:95–119.
- 22 Martínez de la Escalera G, Clapp C: Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion: insights from GT1 immortal GnRH neurons. *Arch Med Res* 2001;32:486–498.
- 23 Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI: Estrogen action via the G-protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 2002;16:70–84.
- 24 Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J: Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 2005;146:624–632.
- 25 Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER: A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005;307:1625–1630.
- 26 Sawyer CH, Markee JE, Hollinshead WH: Inhibition of ovulation in rabbit by the adrenergic-blocking agent dibenamine. *Endocrinology* 1947;41:395–402.
- 27 Sawyer CH: Stimulation of ovulation in the rabbit by the intraventricular injection of epinephrine or norepinephrine. *Anat Res* 1952;112:385–391.
- 28 De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E: Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10972–10976.
- 29 Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH: The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003;349:1614–1627.
- 30 Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL: The KISS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:1357–1363.
- 31 Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–159.
- 32 Bernard PS, Wittwer CT: Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002;48:1178–1185.
- 33 El Majdoubi M, Sahu A, Plant TM: Effect of estrogen on hypothalamic transforming growth factor α and gonadotropin-releasing hormone gene expression in the female rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 1998;67:228–235.
- 34 Legan SJ, Karsch FJ: Modulation of pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing factor during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 1975;96:571–575.
- 35 Sarkar DK, Fink G: Luteinizing hormone-releasing factor in pituitary stalk plasma from long-term ovariectomized rats: effects of steroids. *J Endocrinol* 1980;86:511–524.
- 36 Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ: The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 1990;127:1375–1384.
- 37 Xia L, Van Vugt D, Alston EJ, Luckhaus J, Ferin M: A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1992;131:2812–2820.
- 38 Barraclough CA: Neurotransmitter regulation of luteinizing hormone-releasing hormone neuronal function. *Acta Biol Hung* 1994;45:189–206.
- 39 Wuttke W, Jarry H, Feleder C, Moguilevsky J, Leonhardt S, Seong JY, Kim K: The neurochemistry of the GnRH pulse generator. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1996;56:707–713.
- 40 Radovick S, Ticknor CM, Nakayama Y, Notides AC, Rahman A, Weintraub BD, Cutler GB Jr, Wondisford FE: Evidence for direct estrogen regulation of the human gonadotropin-releasing hormone gene. *J Clin Invest* 1991;88:1649–1655.
- 41 Butler JA, Sjöberg M, Coen CW: Evidence for oestrogen receptor α -immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone-expressing neurones. *J Neuroendocrinol* 1999;11:331–335.

- 42 Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kallo M, Goubillon ML, Coen CW: Oestrogen receptor β -immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol* 2001;13:741–748.
- 43 Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL: Detection of estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid and ^{125}I -estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 2000;141:3506–3509.
- 44 Abraham IM, Han SK, Todman MG, Korach KS, Herbison AE: Estrogen receptor β mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J Neurosci* 2003;23:5771–5777.
- 45 Lagrange AH, Ronnekleiv OK, Kelly MJ: Estradiol-17 β and μ -opioid peptides rapidly hyperpolarize GnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback? *Endocrinology* 1995;136:2341–2344.
- 46 Martínez-Morales JR, Morales A, Marín R, Hernández-Jiménez JG, Acevedo A, Guerra B, Hernández G, López-Coviella I, Prieto L, Alonso R: Estrogen modulates norepinephrine-induced accumulation of adenosine cyclic monophosphate in a subpopulation of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone secreting neurons from the mouse hypothalamus. *Neurosci Lett* 2001;298:61–64.
- 47 Watanabe T, Nakai Y: Electron microscopic cytochemistry of catecholaminergic innervation of LHRH neurons in the medial preoptic area of the rat. *Arch Histol Jpn* 1987;50:103–112.
- 48 Miller MM, Zhu L: Ovariectomy and age alter gonadotropin hormone-releasing hormone-noradrenergic interactions. *Neurobiol Aging* 1995;16:613–625.
- 49 Weesner GD, Krey LC, Pfaff DW: Alpha-1-adrenergic regulation of estrogen-induced increases in luteinizing hormone-releasing hormone mRNA levels and release. *Mol Brain Res* 1993;17:77–82.
- 50 Adler BA, Johnson MD, Lynch CO, Crowley WR: Evidence that norepinephrine and epinephrine systems mediate the stimulatory effects of ovarian hormones on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 1983;113:1431–1438.
- 51 Barraclough CA, Wise PM, Selmanoff MK: A role for hypothalamic catecholamines in the regulation of gonadotropin secretion. *Recent Prog Horm Res* 1984;40:487–529.
- 52 Drouva SV, Laplante E, Kordon C: Alpha-1-adrenergic receptor involvement in the LH surge in ovariectomized estrogen-primed rats. *Eur J Pharmacol* 1982;81:341–344.
- 53 Gearing M, Terasawa E: The α_1 -adrenergic neuronal system is involved in the pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone in the ovariectomized female rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 1991;53:373–381.
- 54 Clarke IJ, Scott CJ, Pereira A, Pompolo S: The role of noradrenaline in the generation of the preovulatory LH surge in the ewe. *Domest Anim Endocrinol* 2006;30:260–275.
- 55 Kreda SM, Sumner M, Fillo S, Ribeiro CM, Luo GX, Xie W, Daniel KW, Shears S, Collins S, Wetsel WC: Alpha-1-adrenergic receptors mediate LH-releasing hormone secretion through phospholipases C and A_2 in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology* 2001;142:4839–4851.
- 56 Lee A, Talley E, Rosin DL, Lynch KR: Characterization of α_2A -adrenergic receptors in GT1 neurosecretory cells. *Neuroendocrinology* 1995;62:215–225.
- 57 Martínez de la Escalera G, Choi ALH, Weiner RI: Beta-1-Adrenergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology* 1992;131:1397–1402.
- 58 Findell PR, Wong KH, Jackman JK, Daniels DV: Beta-1-Adrenergic and dopamine (D_1) receptors coupled to adenylyl cyclase activation in GT1 gonadotropin-releasing hormone neurosecretory cells. *Endocrinology* 1993;132:682–688.
- 59 Uemura T, Nishimura J, Yamaguchi H, Hiruma H, Kimura F, Minaguchi H: Effects of noradrenaline on GnRH-secreting immortalized hypothalamic (GT1-7) neurons. *Endocr J* 1997;44:73–78.
- 60 Petitti N, Karkanias GB, Etgen AM: Estradiol selectively regulates α_1B -noradrenergic receptors in the hypothalamus and preoptic area. *J Neurosci* 1992;12:3869–3876.
- 61 Karkanias GB, Ansonoff MA, Etgen AM: Estradiol regulation of α_1B -adrenoceptor mRNA in female rat hypothalamus-preoptic area. *J Neuroendocrinol* 1996;8:449–455.
- 62 Karkanias GB, Li CS, Etgen AM: Estradiol reduction of α_2 -adrenoceptor binding in female rat cortex is correlated with decreases in α_2A/D -adrenoceptor messenger RNA. *Neuroscience* 1997;81:593–597.
- 63 Pompolo S, Pereira A, Estrada KM, Clarke IJ: Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology* 2006;147:804–810.
- 64 Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y: Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 2004;145:3613–3618.
- 65 Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA: Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G-protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1761–1766.
- 66 Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA: Kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone neurons and regulation of Kiss-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004;80:264–272.
- 67 Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, Gaytan F, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena-Sempere M: Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol* 2004;561:379–386.
- 68 Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T: Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:383–388.
- 69 Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillo WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR: Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 2004;16:850–858.
- 70 Nazian SJ: Role of metastin in the release of gonadotropin-releasing hormone from the hypothalamus of the male rat. *J Androl* 2006;27:444–449.
- 71 Seminara SB, Dipietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF Jr, Plant TM: Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* 2006;147:2122–2126.
- 72 Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA: Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005;146:3683–3685.
- 73 Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J: Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 2005;146:624–632.
- 74 Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr: Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via transactivation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 2000;14:1649–1660.
- 75 Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI: Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 2002;16:70–84.
- 76 Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Ando S: The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17 β -estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279:27008–27016.
- 77 Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER: A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005;307:1625–1630.