

169
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"LA ESTIMULACIÓN DOPAMINÉRGICA DE LA SECRECIÓN DE GnRH EN
CÉLULAS GT1-1 NO INVOLUCRA LA PRODUCCIÓN DE FOSFATOS DE
INOSITOL"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGA

PRESENTA

CITLALI TRUETA SEGOVIA



MÉXICO, D.F.



FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "LA ESTIMULACION DOPAMINERGICA DE LA SECRECION DE GnRH EN CELULAS GT1-1 NO INVOLUCRA LA PRODUCCION DE FOSFATOS DE INOSITOL"

realizado por CITLALI TRUETA SEGOVIA

con número de cuenta 9150687-6 , pasante de la carrera de BIÓLOGO

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Propietario

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario

Dra. María Luisa Fanjul Peña

Suplente

Dr. Emilio Rojas del Castillo

Suplente

Bip. ~~Señor~~ la Rosas
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Depto. de Biología

COORDINACION GENERAL

Este trabajo fué realizado en el Centro de Neurobiología de la U.N.A.M. bajo la dirección del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, y apoyado por becas de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (proyecto IN200393) y la Coordinación de Apoyo a Programas Académicos.

**A la miss
y
a la iaia.**

Agradecimientos

-A Ricardo Pineda por su gran ayuda en la elaboración y corrección de este trabajo y por su gran cariño y apoyo de siempre.

-A Gonzalo, por guiar tan acertadamente mi formación tanto académica como personal y por sus agradables conversaciones dentro y fuera del laboratorio.

-A Dirk y Zaira por enseñarme la técnica de determinación de fosfatos de inositol en células GT1, por su valiosa ayuda en el laboratorio, su amistad y su cariño.

-A todos mis compañeros del laboratorio por su gran apoyo y por crear un ambiente de trabajo tan agradable.

-A Emilio Rojas, María Eugenia Gonsebatt, María Luisa Fanjul y Gaby Rosas por sus valiosos comentarios acerca de este trabajo.

-A Nuri y Manuel por su ayuda en la corrección e impresión de este trabajo y por quererme, aguantarme y apoyarme tanto siempre.

-A mi papá por todo su cariño, sus consejos y sus conversaciones.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	1
RESUMEN	4
1.INTRODUCCIÓN	6
-Importancia de la reproducción.....	6
-Elementos de la reproducción en vertebrados.....	8
-Sistema Neuroendócrino: regulación de la reproducción.....	9
-Regulación de la reproducción por estímulos ambientales e internos. Integración en el SNC.....	11
-El eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas. Control neuroendócrino de la reproducción.....	12
+ El Hipotálamo.....	12
+ La Hipófisis.....	13
Gonadotropos: secreción de gonadotropinas.....	16
+ Las Gónadas.....	17
-Células GnRHérgicas: su origen, distribución y conexiones. Síntesis y secreción de GnRH.....	18
+origen.....	18
+distribución.....	19
+proyección de fibras y conexiones.....	19
+síntesis y secreción de GnRH.....	20
+secreción de GnRH en el sistema porta hipofisiario: regulación de los gonadotropos de la hipófisis anterior.....	21
-Regulación de la secreción de GnRH.....	23
-Señalización intracelular.....	24
-Hidrólisis de fosfoinosítidos: generación de Inositol 1,4,5-trifosfato y Diacilglicerol.....	26

-Tipos de neuromediadores involucrados en la regulación de GnRH.....	29
-Esteroides sexuales.....	29
-Neurotransmisores peptídicos.....	30
-Neurotransmisores clásicos.....	31
-Catecolaminas.....	31
+Consideraciones generales.....	31
+Dopamina.....	33
++Receptores de dopamina.....	33
-El papel de las Catecolaminas y en particular de la Dopamina en la regulación de la secreción de GnRH.....	36
+Anatomía del sistema dopaminérgico y la acción de la dopamina sobre la secreción de GnRH.....	36
-Biología celular y molecular de las neuronas GnRHérgicas.....	41
-Antecedentes específicos.....	44
2.OBJETIVO.....	46
3.MATERIAL Y METODO.....	46
Cultivos celulares.....	46
Determinación de la producción de fosfatos de inositol en células GT1-1.....	47
-Tratamiento farmacológico.....	47
-Fraccionamiento subcelular.....	48
-Separación por columnas Dowex.....	48
-Reutilización de la resina.....	49
Diseño experimental.....	49

4.RESULTADOS.....	51
-Producción de fosfatos de inositol en respuesta a DA en las células GT1-1: relación dosis-respuesta y curso temporal del efecto.....	51
-Efecto de la Forskolina sobre la producción de IPx en células GT1-1.....	53
-Efecto de agonistas D1 y D2 dopaminérgicos sobre la producción de IPx en células GT1-1.....	53
-Efecto de antagonistas D1 y D2 dopaminérgicos sobre la estimulación dopaminérgica de la producción de IPx en células GT1-1.....	54
-Efecto de antagonistas H1 histaminérgico, α y β adrenérgicos sobre la estimulación dopaminérgica de la producción de IPx.....	55
5.DISCUSIÓN.....	57
REFERENCIAS.....	65

RESUMEN

La reproducción sexual de los mamíferos es una función muy compleja que requiere una fina coordinación para integrar tanto estímulos ambientales como internos y acoplar la producción y liberación de los gametos con la cópula, el nacimiento y el cuidado de las crías. Esta coordinación es llevada a cabo por el sistema neuroendócrino, que integra todos los estímulos que influyen en la reproducción y regula las funciones reproductivas a través de una vía final común, residente en las neuronas secretoras de GnRH. La secreción de GnRH es regulada por un gran número de neuromoduladores y neuromediadores, entre los que destacan por su importancia las catecolaminas. Sin embargo, el papel de la dopamina (DA) sobre la regulación de la secreción de GnRH ha resultado controversial, ya que un gran número de investigadores han reportado un efecto facilitador de la DA sobre esta secreción, mientras que otros han encontrado que presenta un efecto inhibitorio, además de resultados que indican una ausencia de efecto de este neurotransmisor sobre dicho sistema. Debido a los resultados contradictorios reportados en la literatura, se ha estudiado el efecto de la dopamina sobre la línea neuronal GT1, que son células GnRHérgicas transformadas por tumorigénesis dirigida con el potente oncogén antígeno T del virus de simio 40. Esta línea celular inmortalizada representa un modelo homogéneo y aislado que permite el estudio directo de la biología celular y molecular de las células GnRHérgicas. En las células GT1, la dopamina estimula la secreción de GnRH aumentando la amplitud de los pulsos de secreción. Esto lo hace, al menos en parte a través de receptores D1 acoplados positivamente a la adenilato ciclasa. La norepinefrina (NE), otra catecolamina de gran importancia en la regulación de la reproducción, también estimula la secreción de GnRH en la línea neuronal GT1 en parte a través de receptores β_1 -adrenérgicos acoplados positivamente a la adenilato ciclasa, pero la eficacia de la DA para estimular la producción de AMP cíclico es del doble de la de la NE. Esto plantea la posibilidad de que otras vías de señalización, y quizá otros receptores estén involucrados en los mecanismos de acción de

alguna o ambas catecolaminas. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos está involucrada en la acción dopaminérgica sobre la secreción de GnRH y si esta participación puede explicar las discrepancias observadas, así como encontrar el tipo de receptor que media este efecto. Para ello, se midió la producción de ^3H -fosfatos de inositol por cromatografía de intercambio aniónico en células GT1-1 marcadas durante 48 horas con ^3H -inositol, y tratadas con diferentes agonistas y antagonistas dopaminérgicos.

La producción de fosfatos de inositol (IPx) fue estimulada por la dopamina, de forma dependiente de la dosis, pero solamente en un rango de concentraciones mayores a 10^{-5} M, lo cual discrepa con la potencia observada para estimular la secreción de GnRH, donde se obtienen respuestas máximas con concentraciones de 10^{-6} M. El efecto de la dopamina es dependiente del tiempo, alcanzando un máximo aproximadamente a partir de los 30 minutos, lo cual representa una dinámica tardía con respecto a la de la estimulación de la secreción, que muestra respuestas significativas desde los 2-5 minutos. El efecto no parece ser secundario a la producción de AMP cíclico, ya que el tratamiento con forskolina, un activador directo de la adenilato ciclasa, no estimuló la producción de fosfatos de inositol. El efecto de la dopamina sobre IPx parece ser mediado por receptores dopaminérgicos de tipo D2 acoplados con baja eficiencia a la transducción de la señal intracelular, ya que es bloqueado por el antagonista selectivo D2 spiroperidol, pero no por el antagonista D1 SCH-23390. Sin embargo no es mimetizado completamente por el agonista D2 bromocriptina.

Por todos estos resultados, proponemos que la estimulación dopaminérgica de la producción de fosfatos de inositol no explica las diferencias observadas entre la DA y la NE para estimular la producción de AMP cíclico y la secreción de GnRH, y dada la baja potencia y la dinámica tardía del efecto, la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos no parece estar involucrada de manera fisiológica en la regulación dopaminérgica de la secreción de GnRH.

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo responde a una pregunta importante dentro del conocimiento de la regulación de una de las funciones fundamentales de los seres vivos: la reproducción. Utilizando un modelo celular inmortalizado, se investigaron algunos mecanismos de señalización intracelular activados por señales aferentes involucradas en la regulación de la secreción de la hormona que orchestra las funciones reproductivas. En particular se analizó si la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos está involucrada en la estimulación de la secreción de GnRH producida por la dopamina.

IMPORTANCIA DE LA REPRODUCCIÓN.

La reproducción es una función de vital importancia para las especies, ya que hace posible su continuidad a lo largo del tiempo. Además, está inseparablemente ligada a la evolución, ya que los cambios genéticos que ocurren en las poblaciones requieren ser heredados a las generaciones posteriores para ser fijados en la población. La evolución es causada básicamente por los procesos de mutación, recombinación genética y selección natural. La recombinación genética permite que haya variabilidad hereditaria en las poblaciones, lo cual es necesario para que ocurra la selección natural. Cuando se producen cambios en diferentes poblaciones de la misma especie que llevan a la diversificación de ésta, el surgimiento de barreras reproductoras entre los distintos grupos puede hacer permanente la diversificación. La reproducción, entonces, es la base de la evolución biológica y es la función que permite que las especies se perpetúen en el tiempo.

La forma de reproducción más compleja, y con un mayor grado de evolución es la reproducción sexual de los mamíferos. Sin embargo, existen otros tipos de reproducción, tanto sexual como asexual a lo largo de la escala

filogenética. La reproducción asexual fue la primera en aparecer, y la más sencilla. Por medio de ella se forman organismos genéticamente idénticos a los progenitores. Algunas formas de reproducción asexual son: la bipartición, en la cual una célula duplica su genoma y se divide en dos; la gemación, en la cual el nuevo individuo surge como un "brote" del progenitor; la propagación vegetativa, que consiste en la formación de un nuevo individuo a partir de una parte del organismo progenitor; la esporulación, en la cual se forman estructuras de propagación con la misma información genética del individuo productor, etc. La reproducción asexual se presenta en organismos procariontes como las bacterias, y también en muchos eucariontes como los protozoarios, los hongos, algunos metazoarios y las plantas, aunque muchos de estos tienen alternancia de generaciones sexuales y asexuales.

En muchos organismos, la información genética de cada célula está duplicada, es decir, las células son diploides. Esto permite que al haber dos copias de cada gen (en cromosomas homólogos), pueda haber una recombinación entre ellas, lo cual produce variabilidad genética, aún habiendo reproducción asexual.

Sin embargo, un proceso por medio del cual es posible aumentar la variabilidad, es el intercambio y recombinación (entrecruzamiento) de la información de los cromosomas homólogos que se da en la reproducción sexual gracias a la meiosis. En la reproducción sexual se producen gametos haploides (con un solo juego de cromosomas), que al fusionarse restablecen el número diploide de cromosomas. Al restablecerse la diploidía, el nuevo organismo tendrá características tanto del padre como de la madre, y como cada uno de los gametos sufrió un proceso de recombinación similar, se obtiene una gama más amplia de caracteres para poder adaptarse y sobrevivir.

La reproducción sexual apareció tempranamente en la escala filogenética y ha ido evolucionando y especializándose, lo cual ha permitido aumentar el éxito reproductivo y adaptativo de las especies.

En los vertebrados se observa un alto grado de especialización reproductiva a partir por ejemplo del surgimiento del huevo amniota, que permite a los organismos reproducirse en el ambiente terrestre, ya que crea un medio líquido adecuado para el desarrollo del embrión, dentro del huevo. Otro salto evolutivo de gran importancia lo constituyó la aparición de los mamíferos placentarios. La viviparidad aumenta la probabilidad de supervivencia, ya que el embrión se desarrolla dentro del cuerpo materno, lo que disminuye el riesgo de ser alcanzado por los depredadores. En este tipo de reproducción se desarrollan además mecanismos para el cuidado y la alimentación de las crías, como la lactancia y ciertos aspectos conductuales que permiten que aumente la probabilidad de sobrevivir de los nuevos individuos de la especie, asegurando así la permanencia de los cambios genéticos. La reproducción sexual vivípara de los mamíferos es entonces una función altamente compleja, que requiere una fina coordinación. En lo sucesivo, al hablar de reproducción, a menos que se indique lo contrario, nos referiremos a éste tipo de reproducción.

ELEMENTOS DE LA REPRODUCCIÓN.

La formación de gametos o gametogénesis se lleva a cabo en las gónadas (ovarios y testículos) y consiste primeramente de dos divisiones celulares (meiosis) durante las cuales se da la recombinación de los cromosomas homólogos de las células germinales y la formación de células haploides, que posteriormente sufren un proceso de maduración para finalmente ser liberadas para la fecundación.

La liberación de los gametos femeninos se encuentra sincronizada temporalmente a la receptividad de la hembra para la cópula, lo cual aumenta la probabilidad de éxito en la fecundación interna. Esto involucra una serie de aspectos conductuales y la preparación del tracto reproductor para la cópula y la gestación. Además, en animales con reproducción estacionaria, la fecundación ocurre un cierto tiempo antes de la estación adecuada para el

nacimiento de las crías. Este tiempo tiene relación con la duración del periodo de gestación de cada especie particular, de modo que transcurrido éste, las crías nacen en una época favorable en cuanto a temperatura ambiental y a la disponibilidad de alimento. De este modo, para cada especie los estímulos ambientales que favorecen la cópula como son la duración del día, la temperatura ambiental, etc., son diferentes dependiendo de la duración del periodo de gestación. En el caso de los mamíferos, se acopla también la liberación de los gametos a la preparación del útero para la implantación y el desarrollo del embrión, y finalmente, a la preparación de la madre para el cuidado y alimentación de las crías. Todo esto requiere un complejo sistema de control que integre y regule las funciones de cada uno de los elementos involucrados en el sistema reproductor. Esta regulación está desempeñada por el sistema neuroendócrino, que integra la información proveniente tanto del medio ambiente como del medio interno, para mantener el funcionamiento adecuado del sistema reproductor. Se habla de sistema neuroendócrino como el conjunto de órganos tanto neurales como glandulares, que actuando de manera integral regulan una serie de funciones vegetativas y reproductivas. El sistema neuroendócrino coordina el funcionamiento del sistema reproductor a través de mensajeros químicos que comunican de forma integral a los distintos órganos involucrados en la reproducción.

SISTEMA NEUROENDÓCRINO: REGULACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN.

En el control de la reproducción interviene una gran cantidad de órganos del sistema neuroendócrino, estableciendo complejas redes de comunicación. Sin embargo, el control central de las funciones reproductivas reside en ciertos elementos en la base del cerebro y en la hipófisis, por lo que, para simplificar su estudio, se habla de un eje hipotálamo-hipófisis-gónadas en el cual cada uno de los órganos mencionados regula al siguiente mediante la secreción de

hormonas y además existen asas de retroalimentación tanto positiva como negativa a todos los niveles, que informan al sistema del grado de funcionamiento del mismo. De forma general y simplificada el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas funciona de la siguiente manera:

En el cerebro se procesa una gran cantidad de señales neurogénicas externas e internas que afectan a la reproducción, y toda esta información es integrada en una vía final común, constituida por neuronas especializadas, que en algunas especies residen en el hipotálamo, y en otras en áreas anteriores a éste. Estas neuronas regulan a la hipófisis secretando a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH por sus siglas en inglés), que actúa sobre los gonadotropos de la hipófisis, estimulándolos para que secreten a la hormona estimulante de los folículos (FSH por sus siglas en inglés), y a la hormona luteinizante (LH), llamadas en conjunto gonadotropinas. De esta forma, la señal hipotalámica es amplificada varias veces, ya que una molécula de GnRH es capaz de facilitar la liberación de varias moléculas de gonadotropinas. Estas hormonas tienen como órgano blanco a las gónadas, en donde estimulan a su vez la formación y liberación de los gametos y la secreción de hormonas esteroides, como los estrógenos, andrógenos y progestágenos. Aquí la señal hormonal es amplificada aún más, y finalmente los esteroides intervienen también en la regulación de la gametogénesis, además de tener una gran cantidad de efectos extragonadales, entre los que se encuentran la acción sobre el útero, en el caso de las hembras, en donde intervienen en el crecimiento del endometrio en preparación para la implantación del cigoto en caso de haber fecundación, la modulación de la conducta y la libido, y la aparición y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios. Los esteroides sexuales, además, ejercen asas de retroalimentación negativa y positiva a nivel de la producción de GnRH y gonadotropinas.

-Regulación de la reproducción por estímulos ambientales e internos. Integración en el Sistema Nervioso Central.

La reproducción es influenciada por factores provenientes del ambiente externo que se integran en el Sistema Nervioso Central (SNC), lo cual permite la coordinación de la actividad reproductiva con los factores ambientales indicadores de las condiciones adecuadas para el desarrollo de las crías. Entre estas señales ambientales están la duración del día, la cantidad de luz, la temperatura, la disponibilidad de alimento y la receptividad del sexo opuesto. Los estímulos luminosos pueden afectar la ovulación por una vía directa que une la retina con el núcleo supraquiasmático, o por vías multisinápticas que involucran a éste núcleo, a ganglios cervicales superiores y la glándula pineal (Fink, 1988). Sin embargo, poco sabemos de los mecanismos por los que se integran la mayoría de estos estímulos en el cerebro. Además de los estímulos ambientales, hay factores internos del organismo, como el metabolismo, la cantidad de grasa, el peso y las emociones, que también tienen una influencia sobre la reproducción (Fink, 1988).

La actividad de las neuronas hipotalámicas involucradas en la reproducción es entonces fuertemente influenciada por proyecciones de todo el SNC, así como por diversas hormonas provenientes de distintas glándulas endócrinas. Toda la información que influye a la reproducción, converge finalmente en las células GnRHérgicas, que constituyen la vía final común de integración de la información recibida y responden secretando una hormona que orquesta el resto de las funciones reproductivas: la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

- El eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas. Control neuroendócrino de la reproducción.

+El Hipotálamo

El hipotálamo es una parte del cerebro, localizada en su base, sobre la hipófisis, cuyos límites se han fijado por convención desde la lámina terminal hasta un plano vertical caudal a los cuerpos mamilares, y desde el surco hipotalámico hasta el piso del III ventrículo, aunque en realidad, sus límites anatómicos no son muy claros.

El hipotálamo recibe fibras nerviosas que comprenden vías ascendentes viscerales y somáticas, vías sensoriales olfatorias, y fascículos desde el mesencéfalo, diencefalo, estructuras límbicas y neocórtex. De él salen vías de control del sistema nervioso autónomo periférico, la hipófisis y epífisis, y el sistema endócrino. Además, el hipotálamo tiene sistemas neuronales intrínsecos, que nacen y terminan dentro de ésta estructura.

En el hipotálamo se regula el estado general del organismo, controlando la homeostasis de las funciones vegetativas. El hipotálamo participa en funciones específicas, entre las que se encuentran el control endócrino del organismo a través de factores que influyen en la secreción de hormonas en la hipófisis anterior, la neurosecreción de oxitocina y vasopresina, la regulación de la temperatura corporal, la regulación de la ingesta de alimentos y agua, la regulación de los relojes biológicos, la modulación de sensaciones como emoción, rabia, miedo, aversión, placer y recompensa, y efectos autonómicos generales por la mediación de la actividad simpática y parasimpática.

El hipotálamo realiza algunas de estas funciones sintetizando y secretando a la circulación del sistema porta hipofisario hormonas que al actuar sobre células blanco en la hipófisis, estimulan la secreción de otras hormonas. Entre las hormonas peptídicas clásicas que secretan neuronas hipotalámicas se

encuentran la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH), la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) la oxitocina y la vasopresina. Muchas de estas hormonas, actúan sobre células de la hipófisis, estimulando la secreción de otras hormonas, que a su vez entran a la circulación sistémica para actuar sobre sus órganos blanco, integrando así una parte importante del sistema neuroendócrino. Además, en el hipotálamo se producen sustancias como la dopamina (DA), la norepinefrina (NE), la epinefrina (E) y la serotonina (5-HT), que pueden actuar como neurotransmisores, facilitando la comunicación sináptica, o como hormonas, entrando a la circulación para ejercer sus efectos a distancia. Muchas de las células hipotalámicas tienen proyecciones hacia la neurohipófisis, donde liberan su contenido. Algunas proyectan sus fibras hacia otras zonas, entre ellas una protuberancia del hipotálamo llamada eminencia media, que consiste mayormente en axones peptidérgicos y monoaminérgicos y tiene una gran cantidad de vasos capilares fenestrados del sistema porta hipofisiario en la zona externa. Muchos de los axones que llegan a esta región terminan cerca de los vasos portales hipofisiarios en la zona externa (Rasmussen et al. 1988) y a través de este sistema porta, las sustancias liberadas por las fibras nerviosas en la eminencia media acceden a la hipófisis anterior. En este trabajo, nos centraremos en las hormonas que controlan la reproducción, en este caso, la GnRH, la cual se sintetiza en neuronas hipotalámicas en algunas especies, y en neuronas localizadas en áreas anteriores al hipotálamo en otras.

+La Hipófisis

La hipófisis es una estructura compuesta de elementos neurales y epiteliales que se encuentra en una estructura ósea en la base del cráneo, la silla turca, y está cubierta por un pliegue circular de la duramadre, llamado

tienda de la hipófisis. Se puede dividir básicamente en dos grandes partes, con un origen embrionario distinto: la neurohipófisis, que incluye al tallo infundibular y al proceso infundibular o lóbulo neural, y la adenohipófisis que es la parte glandular de la hipófisis, e incluye la pars tuberalis, la pars intermedia y la pars distalis (ver figura 1.1).

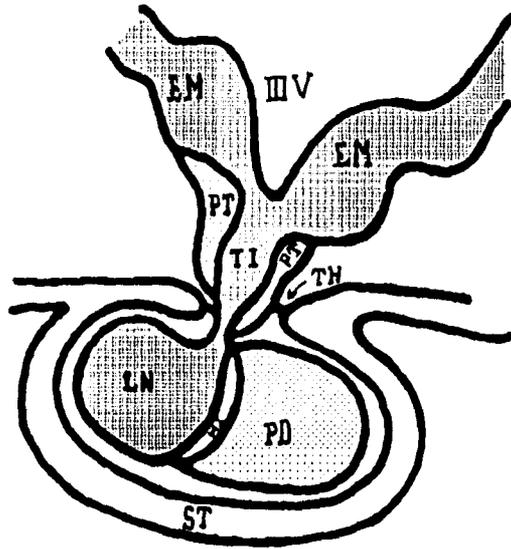


Figura 1.1. Diagrama esquemático de la hipófisis. EM eminencia media; TI tallo infundibular; LN lóbulo neural o proceso infundibular; HI hipófisis intermedia; PT pars tuberalis; PD pars distalis; III V tercer ventrículo; ST silla turca; TH tienda de la hipófisis.

La parte neural de la hipófisis o neurohipófisis se desarrolla a partir del piso del diencefalo y está formada por axones que se originan en neuronas

magnocelulares en los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo, las cuales sintetizan, almacenan y secretan oxitocina y vasopresina, asociadas a sus respectivas neurofisinas I y II, entre otras hormonas. Además tiene capilares y astrocitos asociados. Las terminales nerviosas de la neurohipófisis, liberan hormonas en vasos sanguíneos que van a la adenohipófisis, y a órganos distantes, donde regulan funciones específicas. La porción glandular de la hipófisis o adenohipófisis proviene embriológicamente de una evaginación del tejido ectodérmico de la boca primitiva, llamada bolsa de Ratke. Contiene células epiteliales que sintetizan hormonas protéicas y las secretan en los capilares cercanos.

Los capilares de la adenohipófisis están fenestrados. Las células epiteliales forman cordones y están unidas por desmosomas y uniones estrechas. Esto permite que las hormonas liberadas por cualquier célula puedan penetrar fácilmente en los capilares, y también puedan interactuar con las células vecinas que tengan los receptores adecuados en la membrana. Además, las hormonas provenientes del hipotálamo, o de glándulas distantes, pueden llegar con facilidad a la adenohipófisis por vía sanguínea.

La adenohipófisis secreta hormonas peptídicas clásicas como la hormona estimulante de la tiroides o tirotrópina (TSH), hormona estimulante de los folículos (FSH), hormona luteinizante (LH), prolactina (PRL), hormona del crecimiento (GH), hormona adrenocorticotrófica (ACTH), hormona estimulante de los melanocitos (MSH), además de otros neuropéptidos y mensajeros químicos. Cada hormona es sintetizada y liberada por un grupo específico de células, que se nombran según la hormona que sintetizan. A las células que sintetizan FSH y LH (gonadotropinas), se les llama gonadotropos.

Gonadotropos: secreción de gonadotropinas

Los gonadotropos son las células adenohipofisarias que producen y secretan LH y FSH. El 80% de estas células contiene ambas hormonas; el 10% contiene sólo LH y el 10% sólo FSH (Fink, 1988).

La LH y la FSH son hormonas glicoprotéicas, con un peso molecular de 28-29 kDa, formadas por dos subunidades llamadas alfa y beta, unidas por enlaces no covalentes. La llamada subunidad alfa es común en ambas hormonas, así como en la TSH, mientras que la subunidad beta es específica de cada una de ellas. Están glicosiladas con carbohidratos como N-acetil galactosamina y N-acetil glucosamina, lo cual es una característica importante para su reconocimiento por los receptores (Pierce, 1988).

La secreción de estas hormonas es estimulada por la GnRH, aunque aparentemente la GnRH no es tan potente para estimular la liberación de FSH como la de LH (Clark y Cummins, 1982). La GnRH además estimula la síntesis de RNA mensajero (mRNA) de las subunidades de estas dos hormonas.

Los gonadotropos presentan en sus membranas receptores para GnRH, los cuales aparentemente se acoplan, entre otros mecanismos intracelulares, a la activación de canales de calcio. Se ha observado que, después de una pequeña dosis de GnRH, los gonadotropos presentan una respuesta mucho mayor a una segunda dosis, es decir, la GnRH tiene un efecto "cebador" (priming effect) sobre los gonadotropos. Entre otros mecanismos para explicar este efecto, se ha propuesto que se da por un cambio de orientación de los microfilamentos que provoca una migración de los gránulos de gonadotropinas hacia zonas cercanas a la membrana, de donde pueden ser liberados más fácilmente en respuesta a una segunda estimulación (Fink, 1988).

+ Las Gónadas:

La producción de los gametos, así como la secreción de los esteroides sexuales se lleva a cabo en las gónadas.

Los esteroides sexuales tienen efectos sobre las mismas gónadas, principalmente en la regulación de la gametogénesis, y además tienen una gran cantidad de efectos extragonadales, como la coordinación de cambios en el útero, vagina y glándulas mamarias en la hembra como preparación para la cópula, fertilización e implantación, la aparición y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, la modulación de la conducta y la libido a nivel del sistema nervioso central, etc. Los esteroides gonadales además, ejercen asas de retrocontrol tanto positivo como negativo a nivel hipotalámico e hipofisiario regulando así, directa o indirectamente la secreción de GnRH y gonadotropinas.

Las células de las gónadas tienen receptores a gonadotropinas LH y FSH, las cuales modulan distintas funciones en estos órganos. La FSH actúa en el testículo sobre las células de Sertoli para estimular la espermatogénesis, mientras que la LH actúa principalmente sobre las células de Leydig, donde estimula la producción de testosterona y estradiol. En el ovario, la FSH estimula a las células de la granulosa para inducir el desarrollo de los folículos y la síntesis de estradiol, además de aumentar la capacidad de respuesta a la LH en estas células. La LH a su vez, estimula a las células de la granulosa, y también a las de la teca y a las células lúteas, donde promueve la síntesis de estradiol, progesterona y testosterona. La LH además, promueve la ovulación mediante la degradación del folículo de Graaf por medio de la activación de proteasas séricas.

-Células GnRHérgicas: su origen, distribución y conexiones. Síntesis y secreción de GnRH.

-Origen

El origen y la migración de las neuronas GnRHérgicas ha sido estudiada en el embrión de ratón con mayor detalle que en otras especies. En ésta especie, las neuronas GnRHérgicas se diferencian a partir de la placa olfatoria (Silverman et al., 1994). La mayoría emergen del ciclo mitótico en el día 10.5 de la gestación, y comienzan a expresar el precursor de la GnRH en el día 11.5, aunque no alcanzan la madurez bioquímica hasta después, y por lo tanto no procesan el precursor hasta el día 14.5, cuando ya están en el cerebro anterior. Después de iniciar su diferenciación en la placa olfatoria, migran a través del septo nasal y penetran en el cerebro anterior ventral con las raíces centrales del nervio terminal y los nervios vomeronasales (Silverman et al., 1994; Muske, 1993). En el día 12.5, el número de neuronas GnRHérgicas en el septo nasal es similar al que se observa en el cerebro del adulto, lo que sugiere que esta población proveniente de la placa olfatoria da lugar a todas las células GnRHérgicas del sistema nervioso central, con la posible excepción de algunas ubicadas en el cerebro medio.

Entre los días 12.5 y 16.5, las células penetran en el cerebro ventromedial anterior y migran caudalmente para llegar a las áreas hipotalámicas septal, preóptica y anterior. Una vez allí, se intercalan con poblaciones heterogéneas de neuronas y glia. Durante su migración elaboran procesos axonales que llegan a la eminencia media en el día 14.5.

Parece ser que estas neuronas se basan en señales químicas para seguir sus vías migratorias, ya que no están asociadas a ningún elemento estructural reconocible que pueda servir como sustrato mecánico (Silverman et al., 1994).

-Distribución

La distribución de las neuronas GnRHérgicas parece tener una gran similitud entre las distintas clases de vertebrados, lo que sugiere que estos sistemas neuronales son estructuras filogenéticamente antiguas y conservadas (Muske, 1993).

Las células GnRHérgicas no están agrupadas en núcleos segregados, sino que se encuentran dispersas en varias divisiones citoarquitectónicas. En la mayoría de las especies, forman un continuo difuso en forma de arco, desde la banda diagonal de Broca en el telencéfalo hasta el núcleo de la estría terminalis y otras áreas diencefálicas que incluyen al área periventricular, a las áreas preópticas medial y lateral, al hipotálamo anterior y a la zona retroquiasmática. También incluyen zonas del núcleo supraóptico y algunas dorsales a éste. Estas neuronas son escasas. Su número no rebasa las dos mil (Silverman, 1988).

-Proyección de fibras y conexiones.

La mayoría de las fibras GnRHérgicas se originan en el área preóptica en los núcleos septal, medial preóptico y supraquiasmático, y corren a través del hipotálamo medio basal para terminar en la capa externa de la eminencia media -que es la vía final común de regulación de la hipófisis anterior-, donde la GnRH es liberada en los espacios perivascuales de los capilares fenestrados del sistema porta hipofisario y transportada por la circulación portal a la hipófisis anterior (Barraclough y Wise, 1982). Este haz de fibras GnRHérgicas septo-preóptico-infundibular son las principales reguladoras de la liberación de gonadotropinas en la mayoría de los vertebrados. En peces, anfibios, reptiles y aves, existe además un sistema GnRHérgico posterior independiente del septo-

preóptico que desapareció completamente en los mamíferos placentarios. Este sistema tiene un origen ontogénico diferente de la placa olfatoria (Muske, 1993).

Además de la eminencia media y las áreas hipotalámicas ya mencionadas, las fibras GnRHérgicas se dirigen hacia algunas zonas extrahipotalámicas, como el bulbo olfatorio, regiones no olfatorias del telencéfalo (amígdala, hipocampo, estriado, corteza del cíngulo), centros ventrales incluyendo centros de regulación del comportamiento sexual (región periventricular del cerebro medio), etc. La localización de fibras GnRHérgicas en el bulbo olfatorio se ha relacionado con el papel crítico que juegan las feromonas en la reproducción de los vertebrados, y se ha propuesto que las células GnRHérgicas han evolucionado en conjunción con estas hormonas sexuales para coordinar la recepción de estímulos químicos con la maduración de los gametos (Muske, 1993). En mamíferos, las neuronas GnRHérgicas se distribuyen a través del cerebro anterior y medio, pero no caudalmente a éstos, mientras que en otros vertebrados, llegan hasta zonas del cerebro posterior.

-Síntesis y secreción de GnRH

La GnRH es un decapeptido que es sintetizado como parte de un precursor de mayor tamaño, de aproximadamente 10kD. La secuencia correspondiente a la GnRH está precedida por un péptido señal. En el segmento carboxilo terminal del precursor hay una secuencia que codifica para un péptido de 56 aminoácidos, al que se denomina peptido asociado a GnRH (GAP) (Seeburg y Adelman, 1984). El procesamiento del precursor de GnRH incluye la separación del GAP, la ciclización enzimática de la glutamina amino terminal, y la amidación de la glicina carboxilo terminal. (Martínez de la Escalera et al., 1993).

En los cuerpos celulares del hipotálamo, se ha identificado GnRH en vesículas granulares asociadas con el aparato de Golgi. Se propuso, con base en la evidencia morfológica, que la GnRH es sintetizada en polisomas en el cuerpo celular, empaquetada en vesículas en el aparato de Golgi, y transportada dentro de éstas por el axón, para ser almacenada en la terminal axónica y ser liberada cuando hay una estimulación apropiada. (Fink, 1988).

-Secreción de GnRH en el sistema porta hipofisario. Regulación de los gonadotropos de la hipófisis anterior.

La GnRH es liberada en los vasos portales hipofisarios, y llevada así a la hipófisis anterior, donde estimula la producción y secreción de la LH y la FSH en los gonadotropos. La secreción de la GnRH en la sangre del sistema portal hipofisario se da en forma pulsátil, con intervalos distintos en las diferentes especies estudiadas, variando entre 30 minutos y 3 horas (Carmel et al., 1976; Levine et al., 1982). Aparentemente, la liberación pulsátil de la GnRH es necesaria para la respuesta adecuada de la hipófisis, ya que la administración continua de GnRH a células hipofisarias de rata en perfusión abate la secreción de LH y FSH (Smith y Vale, 1981)

Se ha demostrado que la LH es secretada por la hipófisis también en forma pulsátil, en respuesta a los pulsos de GnRH. En la oveja, los pulsos de LH presentan una clara sincronía con los de GnRH y las amplitudes de ambos se correlacionan adecuadamente (Clarke y Cummins, 1982; Levine et al., 1982). Esto indica que la naturaleza pulsátil de la secreción de LH en la hipófisis es el resultado directo de la secreción pulsátil de GnRH en los vasos portales hipotálamo-hipofisarios. Por lo tanto, medir la secreción de LH en la sangre sistémica es un método sencillo para medir indirectamente la secreción de GnRH.

En general se acepta que la GnRH es liberada por las terminales de la eminencia media en el espacio perivascular de los capilares fenestrados del sistema portal hipofisiario, el cual la transporta hasta la hipófisis anterior. Se ha propuesto una vía alternativa de transporte de la GnRH hasta el sistema porta hipofisiario a través del Órgano Vasculoso de la Lámina Terminal (OVLT), que es un órgano altamente vascularizado y recibe un considerable número de axones inmunoreactivos para GnRH del núcleo preóptico. Sin embargo, esta vía parece poco probable ya que los capilares fenestrados que contiene el OVLT terminan en la circulación sistémica, más que en la portal. Se ha propuesto también que la GnRH proveniente de este órgano pudiera ser liberada en el líquido cerebroespinal del tercer ventrículo, recuperado por los tanicitos de la eminencia media y transportado entonces a los capilares portales hipofisarios. Sin embargo esta hipótesis no ha sido muy aceptada, ya que no se ha encontrado GnRH en el líquido cerebroespinal ni en tanicitos de la eminencia media, por lo que el OVLT no parece ser un órgano muy importante para la liberación de la GnRH que controla la secreción de gonadotropinas y el ciclo ovulatorio. (revisado en Barraclough y Wise, 1982).

Además de la secreción de GnRH en el plexo proximal del sistema porta, se ha propuesto otro sistema de transporte en el que la hormona es secretada en el líquido cerebroespinal ventricular y llevada a los capilares portales vía las células endocelulares en la base del tercer ventrículo. La inyección de GnRH en el tercer ventrículo de la rata hembra estimula la liberación de LH tan rápido como la inyección intravenosa. Sin embargo, Cramer y Barraclough no pudieron demostrar la presencia de GnRH en el líquido cerebroespinal después de la estimulación electroquímica del área preóptica que resultó en un pico de LH (en Sawyer, 1975).

-Regulación de la secreción de GnRH.

Como ya se ha dicho, las células GnRHérgicas reciben una gran cantidad de estímulos provenientes del cerebro anterior, medio y posterior, que regulan la secreción de GnRH al sistema porta hipofisiario. La secreción de GnRH es regulada entonces por un gran número de neuromediadores y neuromoduladores, que incluyen neurotransmisores clásicos como las monoaminas, la histamina, aminoácidos excitadores (L-Glu) e inhibidores (GABA), y una amplia lista de neuromediadores peptídicos, entre los que se encuentran los péptidos opioides, la endotelina, la TRH, la sustancia P, el neuropéptido Y, e incluso la propia GnRH en un mecanismo de asa de retrocontrol ultracorta, además de otras hormonas como los esteroides gonadales. Dentro de las monoaminas, se ha observado que las catecolaminas juegan un papel de particular importancia en la regulación de las neuronas GnRHérgicas, como veremos más adelante.

Los distintos mensajeros químicos que regulan respuestas en diferentes células blanco, actúan desencadenando en el interior de éstas, cascadas de señales que modulan la respuesta celular. A continuación hablaremos de estas cascadas de señalización intracelular.

SEÑALIZACION INTRACELULAR.

Existen básicamente 3 tipos de comunicación intercelular: la comunicación endócrina, que se da entre células que se encuentran alejadas unas de otras y para cuya comunicación es necesario que el mensajero entre al torrente sanguíneo para alcanzar su célula blanco; la comunicación parácrina, que ocurre entre células de distintos tipos que se encuentran muy cercanas y en donde el mensajero puede difundirse en el espacio extracelular para actuar sobre células vecinas pero diferentes; por último, la comunicación autócrina es aquella en que una célula se regula a sí misma y a células vecinas del mismo tipo mediante la liberación de sustancias que actúan sobre la misma célula y las células cercanas.

Para comunicarse entre sí, las células utilizan mensajeros químicos como las hormonas, neurotransmisores, neuromoduladores, etc. Algunas de estas sustancias son capaces de atravesar la membrana de su célula blanco porque son liposolubles. Tal es el caso de las hormonas esteroideas, que pueden entrar a la célula y actuar directamente sobre la maquinaria genética o sobre receptores intracelulares. Sin embargo, la mayoría de las moléculas señalizadoras son hidrofílicas, y no son capaces de penetrar en la célula a través de la membrana. Este tipo de moléculas, actúan entonces a través de proteínas receptoras específicas que se encuentran en la membrana de la célula blanco. Los receptores de membrana, reconocen la molécula específicamente y al interactuar con ella sufren un cambio conformacional que les permite desencadenar dentro de la célula una serie de eventos que transducen la señal, y hacen que la célula blanco responda a ella con acciones como la secreción, la transcripción de algún gen, etc.

Existen varios tipos de receptores de membrana: los unidos a canales iónicos, que al unirse a su ligando abren o cierran temporalmente un canal, cambiando la permeabilidad de la membrana plasmática a cierto tipo de iones; los receptores unidos a enzimas (por ejemplo una cinasa de tirosina), o con

capacidad intrínseca de funcionar como tales cuando son activados, y los acoplados a través de proteínas reguladas por GTP (proteínas G), las cuales a su vez activan a una proteína efectora, que genera señales intracelulares produciendo sustancias llamadas genéricamente "segundos mensajeros".

En el presente trabajo, hablaremos de los mecanismos activados por receptores unidos a proteínas G. Los receptores acoplados a proteínas G son proteínas integrales de membrana formadas de una sola cadena polipeptídica, cuya estructura forma siete dominios transmembranales unidos por asas citoplásmicas y extracelulares (Alberts et al., 1994). Al parecer el dominio transmembranal VII es el más importante para el plegado correcto del sitio de unión, y la especificidad de acoplamiento a proteínas G está en la tercera asa citoplásmica (Robles-Flores, 1993). Se han identificado más de 100 receptores pertenecientes a esta superfamilia, entre los que se encuentran los receptores para adrenalina, acetilcolina, dopamina, histamina, etc. La rodopsina, proteína que es activada por la luz en el ojo de los vertebrados, pertenece también a esta superfamilia, así como la bacteriorodopsina y los receptores que reconocen los factores de apareamiento en levaduras, lo que sugiere que estos receptores pudieron haber evolucionado a partir de los receptores sensoriales que poseían los ancestros unicelulares de los organismos pluricelulares en los que median la comunicación intercelular (Alberts et al., 1994).

Cuando el receptor es activado por la unión de su ligando, sufre un cambio de conformación que le permite unirse a una proteína G. Las proteínas G, son heterotrímeros formados por tres subunidades denominadas α , β , y γ . Existen varios tipos de proteínas G, que se han clasificado en cuatro subfamilias : G_s , G_i , G_q y G_{12} . La subunidad α de las proteínas G está unida a una molécula de GDP. Al unirse al receptor, la afinidad de la subunidad α por GDP disminuye, y el GDP se disocia permitiendo que se una en su lugar una molécula de GTP. Al ocurrir esto, la proteína se desensambla, quedando por una parte el complejo $\beta\gamma$, y por otra la subunidad α unida a GTP. La unión del GTP entonces permite que se exponga un sitio al cual se puede unir una proteína efectora. Al unirse

dicha proteína es activada o inhibida, y entonces es capaz de formar o dejar de formar sustancias que actúan como mensajeros intracelulares o segundos mensajeros (Linder y Gilman, 1992). Entre los sistemas de segundos mensajeros que se conoce son regulados por proteínas G destacan el AMP cíclico, el GMP cíclico, el Ca^{2+} y la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos, entre otros.

-Hidrólisis de fosfoinosítidos: generación de Inositol 1,4,5-trifosfato y Diacilglicerol.

Los fosfoinosítidos constituyen de un 2 a un 8% de los fosfolípidos de la membrana plasmática. Están formados por una molécula de mioinositol (que es un polialcohol cíclico de 6 átomos de carbono) unido a una molécula de ácido fosfatídico, constituyendo fosfatidilinositol. Este último se puede fosforilar convirtiéndose en fosfatidilinositol 4 fosfato (PIP), mismo que puede ser subsecuentemente fosforilado hacia fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂). La activación de proteínas G_q por ciertos receptores resulta en la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC), la cual puede hidrolizar al PIP₂ rompiendo el enlace glicerofosfato para generar Inositol 1,4,5-trifosfato (Ins1,4,5P₃) y Diacilglicerol (DAG) (Marx, 1987; Berridge, 1987; Robles-Flores, 1993). Estas dos sustancias actúan como mensajeros intracelulares o segundos mensajeros y juntos constituyen un mecanismo de señalización intracelular extremadamente versátil que se ha adaptado para controlar respuestas celulares a corto plazo tan versátiles como la contracción muscular, la secreción y el metabolismo (Berridge, 1987).

El Ins1,4,5P₃ se une a receptores en el retículo endoplásmico que funcionan como canales de Ca^{2+} . La unión del Ins1,4,5P₃ provoca una salida de Ca^{2+} de ese depósito intracelular y eleva la concentración citoplásmica de este ión. El calcio citoplásmico libre tiene como función la activación de cascadas metabólicas y otras respuestas celulares.

El DAG, por otro lado, activa a la cinasa de proteínas C (PKC), la cual fosforila a un número importante de componentes celulares y modifica así el funcionamiento de la célula. Para la activación de esta enzima, actúan sinérgicamente el DAG y el calcio. Este ión aparentemente contribuye a la translocación de la enzima desde el citosol hacia la membrana, lo cual es determinante para su activación ya que aumenta la afinidad de la enzima por el DAG (Berridge, 1987).

El Ins 1,4,5 P₃ tiene una vida media de aproximadamente 4 segundos en la célula (Berridge, 1987), ya que es rápidamente metabolizado. Su metabolismo puede seguir dos vías. Puede ser defosforilado a Ins1,4 bifosfato por la enzima Ins1,4,5P₃ 5-fosfatasa. Esta enzima tiene una alta selectividad para defosforilar la posición 5 y no otra. Es muy sensible a los cationes divalentes, ya que requiere magnesio para poder actuar, y es inhibida por cobalto, zinc y plata. La hidrólisis del Ins1,4,5P₃ es bloqueada por espermina y por ácido 2,3-difosfoglicérico (Berridge, 1987). El Ins1,4P₂ es subsecuentemente defosforilado ya sea a Ins 1P o a Ins 4P, ya que la enzima que cataliza esta reacción (inositol bifosfatasa) no es tan selectiva en cuanto a la posición. El último paso en el metabolismo de los fosfatos de inositol es la defosforilación de estos dos fosfoinosítidos y su transformación en mioinositol por la enzima inositol monofosfatasa. Esta enzima es inhibida competitivamente por litio, con una K_i de 1mM (Berridge, 1987). Una vía alternativa de metabolismo del Ins 1,4,5 P₃ es su fosforilación en la posición 3 para formar Inositol 1,3,4,5 tetraquisfosfato. Este es después defosforilado en la posición 5 para formar Ins 1,3,4 P₃, un isómero del Ins 1,4,5 P₃ cuyas actividades biológicas como segundo mensajero no han sido claramente establecidas. Este compuesto es posteriormente defosforilado hasta formar mioinositol. De todos los fosfatos de inositol conocidos, solamente el Ins 1,4,5 P₃ se sabe que tiene actividad de mensajero intracelular para la movilización de calcio (Berridge, 1987), aunque se ha propuesto que el Ins 1,3,4,5 tetraquisfosfato actúa

incrementado la concentración de calcio intracelular al permitir la entrada del ión desde el exterior de la célula (Marx, 1987).

Por su parte el diacilglicerol puede ser fosforilado a ácido fosfatídico por una DAG cinasa, o bien hidrolizado por una DAG lipasa, para formar monoacilglicerol, cuya hidrólisis da lugar al ácido araquidónico, que es el precursor de los eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos).

Las vías metabólicas que siguen el IP3 y el DAG se ilustran en forma resumida en la figura 2.

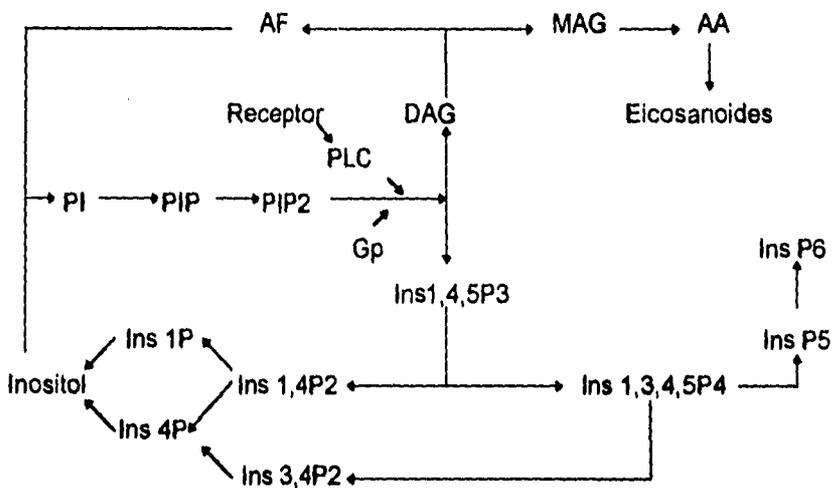


Figura 2. Vías de formación y degradación de los segundos mensajeros resultantes de la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana. MAG monoacilglicerol; AA ácido araquidónico; AF ácido fosfatídico; PI fosfatidil inositol; PIP fosfatidil inositol 4 fosfato; PIP2 fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato.

TIPOS DE NEUROMEDIADORES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE GnRH

Como se describió anteriormente, son muchos y de muy diversos tipos los neuromediadores que intervienen en la regulación de las neuronas GnRHérgicas. Debido a la localización difusa de éstas, los mecanismos y las vías de acción de los neuromediadores que las regulan no son muy claros. Se han utilizado para su estudio distintos modelos experimentales. Algunos de los neuromediadores más representativos que regulan la secreción de GnRH serán expuestos a continuación.

-Esteroides sexuales

Los esteroides sexuales tienen efectos profundos sobre las funciones del cerebro y la hipófisis anterior y juegan un papel muy importante en el control de la secreción de GnRH, sobre la que pueden ejercer retroalimentación tanto positiva como negativa, creando aparentemente una paradoja (ver Fink, 1988). Aparentemente, el tipo de retroalimentación está determinado por la ubicación del animal dentro de su ciclo reproductivo, al menos en el caso de las hembras. Negro-Vilar et al. y Blake et al. (en Sawyer, 1975), reportaron que la inyección intravenosa de estrógenos inhibió inicialmente la liberación de LH y disminuyó la sensibilidad de la hipófisis a GnRH, pero 8 hrs después de la inyección la capacidad de respuesta de la glándula a GnRH aumentó (efecto bifásico). No queda claro sin embargo si su efecto es directo sobre las células GnRHérgicas o a través de interneuronas que a su vez actúan sobre éstas. Así, se ha propuesto que los esteroides sexuales ejercen su acción en parte provocando alteraciones en el funcionamiento de los sistemas catecolaminérgicos centrales, ya que las neuronas GnRHérgicas aparentemente no concentran estradiol (Shivers et al., 1983). Muchas de las neuronas catecolaminérgicas tienen receptores para esteroides, y en muchas áreas del cerebro las células blanco de

estrógenos y andrógenos son rodeadas por terminales catecolaminérgicas, lo que sugiere que las hormonas sexuales pueden tener efectos sobre el funcionamiento de estos sistemas de catecolaminas (Barraclough y Wise, 1982). Se cree también que las neuronas GABAérgicas e histaminérgicas pueden participar como intermediarios de la regulación de la GnRH por los estrógenos. Al parecer, los efectos de los esteroides gonadales sobre la secreción de GnRH también están mediados por neuronas opioidérgicas (ver Hol, 1994).

Debido a las profundas alteraciones que causan los esteroides sexuales sobre la acción de distintos neurotransmisores en la regulación de la GnRH, el modelo que más se ha usado para estudiar el efecto de las catecolaminas sobre dicha secreción es el de la rata ovariectomizada, con o sin tratamiento con estrógenos y progesterona. Después de la ovariectomía, la LH plasmática eleva la magnitud de sus fluctuaciones (Carmel et al., 1976). Los estrógenos suprimen las concentraciones elevadas de LH plasmática reduciendo la amplitud de las oscilaciones. Se ha sugerido que parte de la retroalimentación negativa de los estrógenos para inhibir la secreción de gonadotropinas pudiera ser mediada por un péptido inhibitorio que bloquea la acción de la DA sobre las neuronas GnRHérgicas, ya que la liberación de DA es inhibida por estrógenos, y ésta acción es prevenida por inhibidores de la síntesis de proteínas (Barraclough y Wise, 1982). Por su parte, Carmel et al. (1976) sugieren que la retroalimentación negativa de los estrógenos sobre LH se da directamente sobre la hipófisis, ya que la administración de estradiol no disminuyó los niveles de GnRH en monos Rhesus ovariectomizados.

-Neurotransmisores peptídicos.

Como ya se había mencionado, son muchos los neuropéptidos que intervienen en la regulación de la secreción de GnRH. Algunos de los más representativos son los opioides.

Los péptidos opioides pueden tanto estimular como inhibir la secreción de GnRH de la eminencia media *in vitro*. Estos péptidos además, regulan la secreción de catecolaminas. La regulación opioide de la secreción de DA y/o NE de terminales asociadas con terminales GnRHérgicas en la eminencia media puede mediar la regulación presináptica de la secreción de GnRH (Rasmussen et al., 1988).

La morfina, la met-enkefalina y la β -endorfina bloquean la ovulación en ratas en proestro debido a la inhibición de los picos de LH y FSH producidos por estrógenos y progesterona a través de su acción en el SNC. Todas estas drogas afectan directa o indirectamente la función de los sistemas catecolaminérgicos. Los barbitúricos bloquean el aumento en el recambio de NE que ocurre en la eminencia media en la tarde del proestro. La morfina puede alterar la función de las neuronas DAérgicas indirectamente a través de su acción sobre receptores opioides. La β -endorfina y la enkefalina elevan las concentraciones de PRL en sangre regulando la actividad DAérgica tuberoinfundibular (en Barraclough y Wise, 1982).

-Neurotransmisores clásicos.

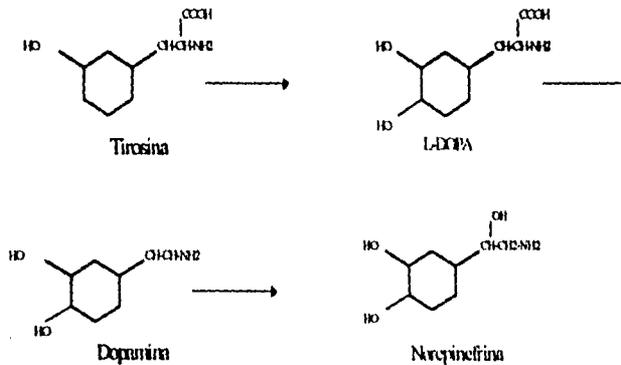
Dentro de los neurotransmisores clásicos que participan en la regulación de las neuronas GnRHérgicas hay también una gran diversidad de moléculas, algunas de las cuales han sido ya mencionadas con anterioridad. Entre ellas, destacan por su importancia las catecolaminas, de las que hablaremos con mayor detalle a continuación:

-Catecolaminas.

+Consideraciones generales.

Las catecolaminas son aminas biogénicas cuya base estructural es el grupo catecol. Se sintetizan a partir del aminoácido tirosina, a través de una oxidación

catalizada por la hidroxilasa de tirosina (TH por sus siglas en inglés), que lo transforma en dihidroxifenilalanina o DOPA. Esta se descarboxila por la acción de la descarboxilasa de DOPA para dar origen a la dopamina. Una segunda oxidación en la cadena lateral de la dopamina, catalizada por la enzima dopamina β-hidroxilasa la transforma en norepinefrina, y una nueva oxidación da lugar a la epinefrina o adrenalina.



La síntesis de catecolaminas está determinada por la actividad de la TH. La activación de esta enzima consiste en la transformación de un estado oxidado a uno reducido, en el que la enzima es activa (Pasantes-Morales, 1993).

La degradación de las catecolaminas es catalizada por dos enzimas: la monoamino oxidasa (MAO), que las convierte en sus aldehídos respectivos, y la catecol-ortometiltransferasa (COMT), que transfiere grupos metilo a las aminas o a sus derivados ácidos o alcoholes. Estas dos enzimas pueden actuar en orden indistinto para degradar a las monoaminas, aunque en general la metilación precede a la oxidación.

+Dopamina.

La dopamina tiene una amplia gama de actividades biológicas en el organismo. Actúa como vasodilatador en los sistemas vasculares renal, mesentérico, coronario y cerebral; es un potente inhibidor de la secreción de prolactina por la hipófisis (Arnold y Martin, 1989). Puede elevar la cantidad de hormona del crecimiento y disminuir la de β -endorfina en plasma. También promueve la secreción de hormona paratiroidea, glucagón e insulina y retrasa la formación de 18-OH-corticosterona en la corteza adrenal. La dopamina además, es un importante regulador del movimiento a nivel del sistema nervioso central (Bloom et al., 1989). Está estrechamente relacionada con la enfermedad de Parkinson, que es un trastorno neurológico que se atribuye a la degeneración de neuronas dopaminérgicas, disminución en la concentración de DA en los ganglios cerebrales y alteración del balance normal entre la estimulación por acetilcolina e inhibición por DA. La DA también está involucrada en respuestas cognitivas y emocionales en el sistema mesolímbico, y puede estar asociada a la esquizofrenia. Por otro lado, algunos de los efectos anoréxicos de las amfetaminas se atribuyen a la liberación de DA.

++Receptores de Dopamina.

Los receptores de DA pertenecen a una gran familia de proteínas con siete dominios transmembranales unidos por asas extracelulares y citoplásmicas, que se acoplan a proteínas G (Sibley, 1991). Con base en su secuencia primaria y en su farmacología (el tipo de sustancias que los pueden activar o bloquear, las vías de señalización a las que se acoplan, etc.), los receptores para DA se han clasificado en diferentes grupos. Hasta hace unos años, se conocían dos tipos de receptores dopaminérgicos, llamados D1 y D2 (Kebabian y Calne, 1979). Posteriormente, en la década de los 80's, se propuso la existencia de receptores adicionales D3 y D4, basándose en las diferentes afinidades de sus ligandos (Sibley, 1991). El receptor D3 fue clonado y se demostró que presenta una alta homología en su secuencia con respecto al

receptor D2, y una farmacología parecida, aunque con afinidades muy distintas y vías de señalización intracelular diferentes (Sibley, 1991). Debido a la similitud con el receptor D2, se ha llamado también D2b. La familia de receptores para dopamina parece ser muy heterogénea, ya que en varios tejidos se ha identificado la presencia de receptores dopaminérgicos que no corresponden con los ya clonados (Ibid.). Sin embargo, la secuencia, farmacología y vías de señalización acopladas a estos receptores no está todavía clara.

En general, se ha reportado que el receptor D1 se acopla principalmente a la estimulación de la adenilato ciclasa a través de proteínas G_s (Watson y Arkininstall, 1994), aunque se ha encontrado que pueden estar también acoplados al metabolismo de fosfoinosítidos (Mahan, 1990). La activación del receptor D2 induce la inhibición de la adenilato ciclasa, con una rápida disminución de los niveles de AMP cíclico, y bloquea también la liberación de calcio dependiente de IP3 (Vallar y Meldolesi, 1989).

En cuanto a la farmacología de los distintos receptores dopaminérgicos, existe una gama más o menos amplia de ligandos disponibles para su estudio. En la tabla 1 se enlistan algunos de los agonistas y antagonistas más utilizados así como sus constantes de afinidad por los distintos receptores.

TABLA 1.

A

	<u>Kd (nM) en ausencia de NaCl</u>				
AGONISTA	D1	D2	D3	D4	D5
Apomorfina	0.7	?	0.66	?	2
Bromocriptina	700	454	4.8	7.4	340
Dopamina	0.8	7.5	3.8	28	?
Fenoldopam	1.6	?	2.8	?	?
Pergolide	0.8	?	0.75	?	?
PHNO	75	?	0.98	?	13
Quinpirole	1,900	?	3.9	?	12
SKF 38393	1-6	?	157	?	?
SKF 81297	3.6	?	320	?	?

B

	<u>Kd (nM) con o sin NaCl</u>				
ANTAGONISTA	D1	D2	D3	D4	D5
Clorpromazina	96	8.5	6	37	133
Clozapina*	172	182	479	9	250
Haloperidol	60	1.3	3-10	5.1	48
Raclopride	18,000	2.9	3.5	237	?
Remoxipride	?	477	2,300	3,685	?
SCH 23390	0.37	1,430	?	3,560	0.3
Spiroperidol	258	0.08	0.6	0.08	4,500
Sulpiride	34,500	14.7	23	52	77,27

0

* Con Na.

Tabla 1. Potencias de distintos agonistas (A) y antagonistas (B) para interactuar con los distintos receptores dopaminérgicos. (Tomado de Peroutka, 1994).

-El papel de las Catecolaminas y en particular de la Dopamina en la regulación de la secreción de GnRH.

El primer indicio de que las catecolaminas estaban involucradas en la secreción de GnRH lo obtuvo Sawyer en 1947, al observar que la dibenamina, un antagonista α -adrenérgico, inhibía la ovulación refleja en conejos. En 1957, Barraclough y Sawyer, encontraron que la reserpina, una sustancia que elimina las catecolaminas de las terminales presinápticas, también suprimía la ovulación en ratas ciclantes, y además producía pseudoembarazo (un índice de secreción de prolactina), probablemente bloqueando receptores a DA en los lactotropos, y/o eliminando la DA de las terminales en la eminencia media. Meyerson y Sawyer, trataron ratas con inhibidores de la monoaminooxidasa (MAO), la enzima que degrada las catecolaminas, y vieron que ésto podía prevenir el efecto inhibitorio de la reserpina (en Barraclough y Wise, 1982). Desde entonces, se ha llevado a cabo una extensa investigación sobre el papel de las catecolaminas en la regulación de las funciones reproductivas.

En general, se ha aceptado que la NE estimula la secreción de GnRH tanto *in vivo* como *in vitro*.

La descripción de los tractos dopaminérgicos tuberoinfundibular e incertohipotalámico que inervan el hipotálamo, establece la posibilidad morfológica de que la dopamina pudiera jugar un papel en el control de la liberación de gonadotropinas y prolactina.

++Anatomía del sistema dopaminérgico y la acción de la dopamina sobre la secreción de GnRH.

Las neuronas dopaminérgicas que inervan el hipotálamo provienen de dos sistemas principales: el incertohipotalámico y el tuberoinfundibular. El sistema incertohipotalámico ha sido descrito por Björklund et al. (1975) como un sistema de fibras catecolaminérgicas (identificadas como DAérgicas) en el tálamo caudal, la zona incerta, el hipotálamo dorsal, anterior y preóptico y el

septo caudal. Las fibras del sistema incerto-hipotalámico inervan la región hipotálamo anterior-área preóptica, la cual es de gran importancia en el control de la liberación de GnRH en la eminencia media. El sistema se puede dividir en dos partes: 1) la caudal se origina en los grupos celulares A11, A12 y A13 y proyecta difusamente a las áreas hipotalámicas anterior y dorsal, a la región dorsal del núcleo dorsomedial y a la zona incerta. 2) la parte rostral constituye un sistema periventricular-preóptico, originado en el grupo celular A14, cuyas células se distribuyen en y lateralmente al núcleo periventricular anterior, y proyecta hacia el núcleo preóptico. Se han descrito contactos sinápticos en esta área entre células GnRHérgicas y dopaminérgicas (Björklund *et al.*, 1975).

Como hay evidencia del control hipotalámico de la secreción de gonadotropinas por mecanismos dopaminérgicos, el sistema incerto-hipotalámico provee posibilidades morfológicas de la influencia de la DA sobre neuronas hipotalámicas secretoras de hormonas hipofisiotróficas en niveles altos del eje hipotálamo-hipófisis (Björklund *et al.*, 1975).

El sistema dopaminérgico tuberoinfundibular tiene sus somas en el núcleo arcuato y en una porción del periventricular. Sus axones proyectan a todas las partes de la eminencia media, al tallo infundibular, y a la pars nervosa e intermedia de la adenohipófisis. Ventrolateralmente, las terminales de estas neuronas se encuentran en la eminencia media, muy cerca de los capilares primarios del plexo portal hipotálamo-hipofisiario, y liberan grandes cantidades de dopamina a la sangre portal. Dorsolateralmente, los axones tuberoinfundibulares terminan en proximidad con terminales axónicas GnRHérgicas (Barraclough y Wise, 1982).

Se ha propuesto que estas neuronas ejercen un control sobre la liberación de GnRH a través de interacciones axoaxónicas en la eminencia media. Aunque los contactos axoaxónicos entre terminales DAérgicas y GnRHérgicas no han sido demostrados concluyentemente, la proximidad anatómica de las terminales de estos dos sistemas en la eminencia media

podrían permitir a las catecolaminas afectar la secreción de GnRH en el sistema portal. Debido a las grandes concentraciones y a sus tasas de recambio elevadas, la NE y la DA en la eminencia media podrían fácilmente atravesar los espacios extracelulares entre las terminales de GnRH y catecolaminas sin la necesidad de terminales axoaxónicas especializadas (Barracough y Wise, 1982).

Se han observado fibras de GnRH muy cerca de neuronas inmunoreactivas para TH en el núcleo paraventricular y arcuato, así como en la eminencia media caudal. Las tinciones para GnRH y TH colocan en la porción ventrolateral de la eminencia media. Aunque la observación de contactos o aposiciones cercanas no es prueba de interacciones funcionales entre las neuronas, estas observaciones sugieren que la DA influye al sistema de GnRH haciendo contacto axosomático con células de GnRH en el complejo septo-preóptico-banda diagonal de Broca, así como contactos axoaxónicos con terminales GnRHérgicas en la eminencia media (Jennes et al., 1983). Leranth et al. (1988) han descrito también contactos axosomáticos y axodendríticos entre fibras DAérgicas y células GnRHérgicas en el área preóptica media.

Estos estudios proveen evidencia morfológica de la posibilidad de una regulación dopaminérgica de la secreción de GnRH. Sin embargo, el papel de la dopamina sobre este aspecto de la reproducción ha resultado controversial, ya que en muchos de los estudios que se han realizado la dopamina ha mostrado tener un papel estimulador sobre dicha secreción, mientras que en muchos otros se reportan resultados inhibitorios y aún de una acción nula de la DA sobre dicha secreción. Se han utilizado diferentes modelos experimentales para estudiar la acción de la dopamina sobre la secreción de GnRH. En general, la especie en la que más se ha estudiado es la rata, pero aún en esta especie las condiciones experimentales empleadas han sido variadas ya que algunos

estudios se han realizado con machos y otros con hembras, ya sea intactas, ovariectomizadas (OVX), u OVX tratadas con esteroides. También la vía de administración, la dosis y la especificidad de los fármacos utilizados varían en los diferentes estudios realizados. Además de los estudios *in vivo* se han realizado estudios con explantes hipotalámicos *in vitro*, lo cual reduce la complejidad del estudio, ya que se elimina una gran cantidad de elementos que podrían modular a distintos niveles la acción de los fármacos administrados, mas no se eliminan todos, ya que incluso dentro de un fragmento pequeño de tejido siguen existiendo distintos tipos de neuronas y fibras que pueden intervenir modulando de distintas formas la acción de dichos fármacos. La gran diversidad de modelos y condiciones experimentales ha resultado en la obtención de datos contradictorios que no han aclarado completamente cuál es el papel de la DA sobre la secreción de GnRH. La mayoría de las evidencias apuntan hacia un efecto facilitador de la dopamina sobre dicha secreción, al menos en ciertas etapas del ciclo ovárico. Así, un gran grupo de investigadores, basándose en estudios farmacológicos *in vivo* (Kamberi et al., 1970; Vijayan y McCann, 1978 a; Vijayan y McCann, 1978 b; Choudhury et al., 1974; Leppälüoto et al., 1976; Negro-Vilar et al., 1982) o con explantes hipotalámicos *in vitro* (Rotszlej et al., 1977; Negro-Vilar et al., 1979), así como en estudios electrofisiológicos (Kaufman et al., 1985) apoyan la idea de que la dopamina facilita la secreción de GnRH. Además, parece que las catecolaminas tienen efectos facilitadores para la transcripción de GnRH, ya que el bloqueo de su síntesis con 6-hidroxidopamina, causa una disminución en la cantidad de mRNA de GnRH en tejidos hipotalámicos *in vitro* (Kim et al., 1993). Sin embargo, hay también un gran cuerpo de evidencias bien sustentadas que sugieren un papel inhibitor de la DA sobre dicha secreción (Drouva y Gallo 1976, 1977; Gallo y Drouva, 1979; Beck et al., 1978). Más aún, existen trabajos en la literatura que reportan una acción nula de la DA sobre este sistema (Krieg y Sawyer, 1976; Blake, 1976; Judd et al., 1978; Boesgaard et al., 1991).

Las diferentes condiciones de estudio, sobre todo el estado endócrino del organismo, podrían explicar estas discrepancias, por ejemplo se sabe que los esteroides gonadales pueden modular la expresión de los receptores en diversos tipos neuronales y así regular la transmisión dopaminérgica en el cerebro. Los esteroides podrían afectar la síntesis protéica en las neuronas del hipotálamo medio basal que tienen receptores para ellos (Rotsztein et al., 1978). De este modo, tanto el momento del ciclo ovárico en que se aplican los diferentes fármacos (Clemens et al., 1977; Judd et al., 1978; MacKenzie et al., 1984) como el tipo de modelo experimental (por ejemplo animales intactos o gonadectomizados con o sin tratamiento de esteroides) (Rotsztein et al., 1978; Gallo y Drouva, 1979) puede determinar la dirección de la respuesta. La dopamina podría tener efectos diferentes a través de distintos tipos de receptores acoplados a varias vías de señalización (Sarkar y Fink, 1981). Por otro lado, podría ser que los diferentes sistemas dopaminérgicos ejerzan distintas acciones sobre la liberación de GnRH (Jennes et al., 1983). Incluso en las mismas áreas, se han descrito diferentes tipos de contactos entre las fibras dopaminérgicas y GnRHérgicas, que podrían representar conexiones con distintas funciones en cuanto a estimulación e inhibición (Leranth, 1988). Por otro lado, la acción de la DA puede ocurrir tanto directamente sobre las neuronas GnRHérgicas como a través de interneuronas de diferentes tipos, algunas de las cuales podrían estimular y otras inhibir la secreción de GnRH (Jarjour et al., 1986; Beck et al., 1978).

Así, los estudios realizados hasta el momento en sistemas tanto *in vivo* como con fragmentos hipotalámicos *in vitro*, no ha permitido conocer exactamente cómo es que la DA influencia la secreción de GnRH, ni si lo hace directamente sobre las células GnRHérgicas o a través de la regulación de interneuronas.

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LAS NEURONAS GnRHÉRGICAS.

Debido a la localización difusa y al escaso número de las células GnRHérgicas, así como al gran número de factores que intervienen en su regulación, los estudios *in vivo* han resultado difíciles de realizar e interpretar. Los cultivos primarios para estudios *in vitro* tienen también la gran desventaja de que son cultivos heterogéneos, en donde siguen interviniendo muchos factores no controlables. De esta forma, no ha resultado posible conocer si los distintos neuromediadores estudiados actúan directamente sobre las células GnRHérgicas o lo hacen a través de interneuronas que a su vez interactúan con éstas. Más aún, en este tipo de estudios, no ha sido posible determinar las vías de señalización intracelular que activan los diferentes moduladores para regular la secreción de GnRH ni los receptores involucrados en esta regulación.

Este problema ha sido solucionado al menos en parte por el desarrollo de líneas celulares GnRHérgicas inmortalizadas por medio de la técnica de tumorigénesis genéticamente dirigida.

La técnica de tumorigénesis genéticamente dirigida consiste en la inducción de un tumor de un tipo celular determinado en algún organismo. Esto se puede lograr en ratones transgénicos, mediante la construcción de una secuencia de DNA que comprende a un oncogén ligado a la secuencia promotora de un gen que normalmente se expresa sólo en el tipo celular que se quiere transformar (por ejemplo la región reguladora de un gen tejido-específico). De esta manera, la expresión del oncogén está ligada a la expresión del gen elegido, y restringida por la activación de la secuencia reguladora escogida. Esta construcción es introducida en cigotos en su fase de una sola célula. Posteriormente, los cigotos son reimplantados en madres pseudoembarazadas, y se examinan los productos al nacer para determinar en cuáles de ellos existe la expresión del transgén. Los individuos que lo expresen, desarrollarán probablemente un tumor en el tejido donde se expresa la secuencia reguladora ligada al oncogén. En ese caso, el tumor es extirpado y

sus células se dispersan y se clonan. A partir de algunas de ellas se pueden establecer líneas celulares inmortalizadas, que expresan el oncogén de manera constitutiva.

En 1990, Mellon et al., utilizando esta técnica en ratones transgénicos, desarrollaron tres líneas neuronales hipotalámicas inmortalizadas, secretoras de GnRH. Para ello, se construyó un gen híbrido que contiene al promotor del gen de GnRH en la región 5', ligado al oncogén antígeno T del virus de simio 40 (SV40).

Habiendo inyectado este gen a varios ovocitos fecundados, se obtuvieron 9 ratones transgénicos estériles, de los cuales 2 desarrollaron tumores hipotalámicos y en uno de éstos dos (GT-1), fue posible identificar un tumor grande en la región que se extiende desde el quiasma óptico hasta la cápsula interna. Se demostró por estudios de expresión (Northern blot), que éste tumor expresaba niveles altos de mRNA de GnRH y de antígeno T, y que la expresión era específica del tejido tumoral.

El tumor fue extirpado y dispersado, mostrando que sus células eran heterogéneas e incluían fenotipos neurales y gliales.

Después de 6 meses de subcultivos para separar las células gliales de las neuronales por distintas propiedades de adherencia al sustrato, se estableció una población celular pura a la que se llamó GT-1, que se clonó por diluciones seriadas, con lo que se logró establecer tres líneas clonales, llamadas GT1-1, GT1-3 y GT1-7.

Todas estas líneas expresan el mRNA de GnRH y del antígeno T y presentan un fenotipo neuronal, que incluye la extensión de neuritas y la expresión de marcadores neuronales como la enolasa neuroespecífica y proteínas de neurofilamentos de 68 kDa. Además expresan mRNA de proteínas específicas de membranas sinápticas como la VAMP-2 y la SNAP-25. Estas líneas celulares no expresan marcadores gliales como la proteína ácida fibrilar glial o la proteína básica de mielina (Mellon et al., 1990).

Las células GT1 procesan el precursor de GnRH a varias formas moleculares incluyendo la GnRH biológicamente activa, y el péptido asociado a GnRH (GAP) (Weiner et al., 1992).

Las líneas neuronales GT-1 son capaces de secretar GnRH en respuesta a la despolarización con K^+ o veratridina, es decir, presentan canales rápidos de Na^+ (Mellon et al., 1990). Además, secretan GnRH espontáneamente de manera pulsátil y sincrónica, lo cual sugiere que la secreción pulsátil de GnRH es una propiedad inherente a las células GnRHérgicas, y no es provocada por otros neuromedadores (Wetsel et al., 1992; Martínez de la Escalera et al., 1992 a; Krsmanovic et al. 1992). La sincronización de los pulsos de GnRH *in vitro* puede darse gracias a los contactos intercelulares que se observan entre las células GT-1 (Wetsel et al., 1992), pero se ha observado que al cultivar estas células en dos placas separadas, se da también una sincronización entre éstas, lo que sugiere que existe un mediador químico difusible que interviene en dicha sincronización (Martínez de la Escalera et al., 1992 a). Este mediador podría ser la misma GnRH, ya que las células GT-1 expresan receptores para esta hormona, y su activación produce un aumento en el calcio intracelular así como un aumento transitorio de la secreción de GnRH, seguido de una supresión de la secreción basal (Krsmanovic et al., 1993).

El desarrollo de estas líneas neuronales inmortalizadas ha permitido el estudio directo de la biología celular y molecular de las células GnRHérgicas, así como su electrofisiología, bioquímica y la regulación que se ejerce sobre la síntesis y secreción de sus productos. En resumen, las líneas GT-1 representan un modelo experimental sumamente útil en el estudio de la neuroendocrinología de la reproducción y la comunicación neuroendócrina. Sin embargo, los resultados obtenidos con las células GT-1 deben ser interpretados con cierto cuidado, ya que son células transformadas, que podrían no reflejar completamente la naturaleza de las células GnRHérgicas *in vivo*.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.

Debido a los resultados contradictorios que aparecen en la literatura con respecto al papel que juega la dopamina en la secreción de GnRH, se ha estudiado el efecto de este neurotransmisor directamente sobre las células GT1 (Martínez de la Escalera et al., 1992 b) y se encontró que ejerce un efecto directo facilitador de la secreción de GnRH. La superfusión de células GT1-1 con dopamina aumenta la amplitud de los pulsos de secreción sin alterar su duración ni su frecuencia. Esto ocurre unos cuantos minutos después de la adición de la dopamina, y se obtienen respuestas máximas con concentraciones de 1 μ M. En cultivos estáticos de células GT1-7, la dopamina estimuló al doble la secreción de GnRH. El efecto estimulante de la dopamina sobre GnRH es mimetizado por el agonista dopaminérgico SKF38393 selectivo de receptores D-1, pero no por el agonista bromocriptina selectivo para receptores D-2. La respuesta además es bloqueada con el antagonista selectivo D-1 SCH-23390, pero no con el antagonista D-2 spiroperidol, lo cual indica la naturaleza del receptor que media el efecto.

La dopamina también estimula la producción de AMP cíclico en las células GT1, elevándola de 5 a 7 veces sobre los niveles previos a la estimulación. Este efecto ocurre con una potencia semejante a la exhibida por la DA para facilitar la secreción de GnRH y con una dinámica rápida y sostenida, lo que indica que el AMP cíclico puede estar mediando la acción estimulante de la dopamina sobre la secreción de GnRH. Este efecto también es bloqueado por la coincubación con SCH-23390, pero no con spiroperidol, y es mimetizado por SKF-38393, pero no por bromocriptina, de manera dosis-dependiente.

Además, la estimulación farmacológica de la adenilato ciclasa con forskolina, aumenta la amplitud y prolonga la duración de los pulsos de GnRH, lo cual sugiere que la adenilato ciclasa está involucrada en el mecanismo de

estimulación dopaminérgica de la secreción de GnRH (Martínez de la Escalera et al., 1992 b). Todo esto es congruente con la hipótesis de que en la estimulación dopaminérgica de la secreción de GnRH participan receptores D1 acoplados positivamente a la adenilato ciclasa. La presencia del receptor D1 en las células GT1 ha sido demostrada, tanto por estudios de unión de radioligandos selectivos (Findell et al., 1993), como por la expresión de la proteína DARPP-32 (fosfoproteína regulada por dopamina y AMP cíclico), la cual se ha encontrado en muchos tejidos en co-expresión con el receptor D1 (Martínez de la Escalera et al., 1992 c).

La norepinefrina también estimula, en la misma medida que la dopamina, la secreción de GnRH en las células GT1. Sin embargo los efectos de ambas no son aditivos. La NE estimula también la producción de AMP cíclico, pero la magnitud del efecto de la NE sobre la formación de AMP cíclico es sólo de la mitad que el de la DA (Martínez de la Escalera et al. 1992 c). La diferencia en la eficacia de ambas catecolaminas para activar la formación de AMP cíclico, a la vez que muestran idénticas potencias para facilitar la secreción de GnRH sugiere que pueden haber otras vías de señalización intracelular involucradas en la estimulación de la secreción de GnRH por DA y/o NE. Los efectos observados podrían ser explicados por los siguientes modelos: 1) pudiera ser que la NE activara, además de la vía del cAMP, otras vías de estimulación, o bien 2) que la DA inhibiera parte del efecto estimulatorio propio que ejerce a través del cAMP, por otra vía de señalización intracelular

En células GT1-1, los receptores para algunos neurotransmisores como la histamina (Hol, 1994) y para algunos péptidos como la endotelina (Krsmanovic et al., 1991) están acoplados a la fosfolipasa C y a la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos. Esto plantea la posibilidad de investigar si la dopamina utiliza también ésta vía de señalización para llevar a cabo la estimulación de la secreción de GnRH.

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fué determinar si la vía de hidrólisis de fosoinositidos está involucrada en la estimulación dopaminérgica de la secreción de GnRH y ver si la participación de ésta vía de señalización puede explicar las discrepancias observadas en la producción de AMP cíclico en respuesta a DA y NE. Para ello se utilizó la línea neuronal GT1-1, que si bien es una línea transformada, es el único modelo disponible para estudiar los mecanismos de señalización intracelular involucrados en las funciones de las células GnRHérgicas. Asimismo, se trató de identificar el tipo de receptor que media el efecto de la DA sobre la producción de IP_x, por medio de estudios farmacológicos.

3. MATERIAL Y MÉTODO

CULTIVOS CELULARES

Las células de la línea neuronal GT₁₋₁, de los pasajes entre el 12 y el 40 se cultivaron en frascos de 75 cm² (Costar corporation, Cambridge, MA), en medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) (todos los reactivos para el cultivo fueron comprados de Gibco BRL Grand Island, N.Y.) complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 100U/ml de penicilina-estreptomicina (P-S). Los cultivos se mantuvieron dentro de un incubador a temperatura constante de 37°C, alta humedad y con concentración de CO₂ de 5% para mantener el pH del medio de cultivo en valores fisiológicos. El medio se cambió cada 3 días, y, cuando las células alcanzaban una confluencia del 90-100%, eran subcultivadas. Esto se realizó retirando el medio de cultivo, y disociando a las células con 5 ml de una solución salina balanceada (HBSS - Hank's Balanced Salt Solution) que contiene tripsina al 0.05% y EDTA·4Na 0.53

mM, para después resenibrar las células en nuevos frascos con medio D-MEM + FBS + P-S.

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL EN LAS CÉLULAS GT1-1.

Para llevar a cabo los ensayos, las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos, cada uno de 9.6 cm² (Costar corporation, Cambridge, MA). En cada pozo, las células se incubaron con 3 ml de D-MEM + FBS + P-S, hasta llegar a un 50-60% de confluencia. Entonces se les cambió el medio por 1.5 ml de D-MEM sin inositol, sin suero y con P-S al que se le adicionó previamente 2 μ Cl/ml de ³H-mioinositol (myo-2-³H-inositol; Amersham, Little Chalfont R.U.). Las células se incubaron durante 48 horas en éste medio con el fin de marcar a saturación las pozas intracelulares de inositol. Al finalizar las 48 horas del marcaje las células fueron lavadas con 1ml de D-MEM sin suero durante 30 a 45 minutos a 37°C. Posteriormente, el medio fue retirado, y reemplazado con 900 μ l de solución amortiguada de fosfatos (D-PBS; Dulb Phosphate-Buffered Saline; Gibco BRL) complementada con 1mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 1mg/ml de glucosa (Sigma) y 10mM de cloruro de litio (LiCl; Merck) pH 7.4, dejándose incubar durante 20 minutos, al cabo de los cuales se inició el tratamiento farmacológico.

-Tratamiento farmacológico

Al cabo de 20 minutos de incubación con PBS + LiCl + glucosa + BSA (PBS-Li), se añadió a las células 100 μ l de éste mismo buffer, en el cual estaba diluida la substancia a probar con una concentración 10X, de modo que la concentración de la misma en el volumen final fuera al 1X. Se incubó durante el tiempo necesario para cada experimento (ver diseño experimental) a 37°C, y posteriormente se detuvo la reacción añadiendo 200 μ l de ácido perclórico al 30% (JT Baker) de forma que la concentración final del mismo fuera de 5%. Inmediatamente después de agregar el ácido, las cajas se pusieron sobre hielo

y se añadió en seguida 200µl de BSA 20 mg/ml, para ayudar a precipitar las proteínas.

-Fraccionamiento subcelular.

Después de detener la reacción, manteniendo las cajas en hielo, se rasparon éstas con un gendarme de plástico (Costar) para desprender las células. Posteriormente, el contenido de cada caja fue transferido a un tubo de 1.5 ml, y centrifugado a 1000 X g durante 4 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos de vidrio de 8cm de largo y 0.8cm de diámetro, y se neutralizó la solución adicionando una gota de indicador universal y la cantidad suficiente de una solución de HEPES 75 mM-KOH 1.5 M para obtener un pH entre 6 y 8, determinado por un color verde pálido. Todo lo anterior se realizó con los tubos en hielo, dejándose incubar de 5 a 120 minutos para favorecer la formación de un precipitado de perclorato de potasio. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 1200 X g durante 4 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a tubos de vidrio de 10 ml previamente cargados con 8ml de un buffer de Hepes 2.5 mM - EDTA 0.5 mM pH 7.4.

-Separación por columnas Dowex.

El sobrenadante neutralizado y diluido se aplicó sobre columnas Poly-Prep de 10 ml (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) con 1.6ml de resina de intercambio aniónico Dowex AG1-X8 forma formato (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA), previamente equilibradas con 3ml de una solución amortiguadora de Hepes 2.5 mM-EDTA 0.5 mM pH 7.4. Se lavaron dos veces con 7 ml de una solución de formato de amonio 30 mM. En este paso se eluye el ³H-inositol (que no tiene carga) y también los fosfogliceroinosítidos marcados.

Posteriormente se añadieron dos veces 6 ml de una solución de formato de amonio 700 mM - ácido fórmico 0.1M para eluir los fosfatos de inositol, recuperando el eluado. 8ml de este último se transfirieron a viales de centelleo de plástico previamente cargados con 12 ml de líquido de centelleo 3a70B (Research Products International Corp., Mount Prospect, IL). Esta mezcla se

agitó vigorosamente y se cuantificó en un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments, Ontario, CA).

-Reutilización de la resina.

La resina se reutilizó de 2 a 3 veces. Para esto fue necesario regenerarla lavando la columna dos veces con 6 ml de formato de amonio 3M - ácido fórmico 0.1M, y luego dos veces con 7 ml de Hepes 2.5 mM - EDTA 0.5 mM pH 7.4. Justo antes del verter el neutralizado, se equilibró la resina con otros 3 ml de esta última solución. Las columnas se guardaron a 4°C entre los experimentos.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

En cada uno de los experimentos, cada determinación se hizo por triplicado. Se realizaron cuatro tipos básicos de experimentos: curso temporal y relación dosis-respuesta de DA, efecto de agonistas dopaminérgicos y experimentos de competencia de la DA con antagonistas. En todos los casos, el control consistió en agregar 100µl de PBS + LiCl + BSA + glucosa a las células previamente incubadas con 900µl de esta misma solución, excepto en los casos en los que los fármacos eran solubles sólo en solventes orgánicos, en cuyo caso se adicionó al control la misma cantidad de vehículo que a los pozos experimentales.

a) Curso temporal: La concentración de dopamina* utilizada para estos experimentos fue de 100µM (concentración final en los pozos), y se dejaron incubar las células durante tiempos de 2, 5, 15, 30, y 60 minutos.

b) Relación dosis-respuesta: Se utilizaron las siguientes concentraciones finales de dopamina *: 1nM, 10nM, 100nM, 1µM, 10µM, y 100µM. Se incubaron las células durante 30 minutos antes de detener la reacción.

c) Agonistas: Se utilizaron los agonistas dopaminérgicos SKF-38393* (D1) y Bromocriptina* (D2), en concentraciones finales de 3, 30 y 300µM. Estos

fármacos fueron disueltos en DMSO (Sigma, St. Louis, MO.) a una concentración 100X y se agregaron 10 μ l de las soluciones a 990 μ l de PBS-Li.

d) Antagonistas: el volumen de PBS-Li agregado a las células inicialmente fue de 800 μ l. A éste se adicionaron 100 μ l de dopamina 1mM y 100 μ l del antagonista SCH-23390* (D1), o spiroperidol* (D2) en concentraciones finales de 10 μ M, 100 μ M ó 1mM. En el caso del spiroperidol, se disolvió en etanol a concentración 100X y se adicionaron 10 μ l a cada pozo con 890 μ l de PBS-Li y 100 μ l de DA 1mM. Se probó también el antagonista histaminérgico H1 clorfeniramina*, y los antagonistas adrenérgicos fentolamina* (α) y propranolol* (β). En todos estos experimentos, el tiempo de incubación fue de 30 minutos, al cabo de los cuales se detuvo la reacción.

Algunos de los experimentos con DA se realizaron en presencia de ácido ascórbico (Sigma, St. Louis, MO) para disminuir la velocidad de oxidación de la dopamina y otros en ausencia de éste.

*Todos los fármacos utilizados fueron comprados de Research Biochemicals International (Natick, MA).

Los resultados se analizaron utilizando la prueba estadística "t" de student para comparar los distintos tratamientos con los controles, con un nivel de confianza de 95%.

4. RESULTADOS

-Producción de fosfatos de inositol en respuesta a DA en las células GT1-1: relación dosis-respuesta y curso temporal del efecto.

Los fosfatos de inositol (IPx: IP1, IP2 e IP3) fueron eluidos todos juntos, ya que en determinaciones previas se observó que la proporción de IP3 eluido separadamente del resto de los fosfatos de inositol es muy baja (ver Hol, 1994). Esto es debido a la rápida degradación de los IPx por las fosfatasa del inositol. La figura 4.1 muestra la producción de fosfatos de inositol en respuesta a dosis crecientes (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM) de dopamina. Se muestran los resultados de 5 experimentos independientes en los que cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado. Los resultados se expresan en valores reales de número de desintegraciones por minuto (DPM) y son el promedio de las tres repeticiones +/- el error estándar de la media. En esta figura se observa que las concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1 y 1 μM de DA no alteran significativamente la producción de fosfatos de inositol ($P < 0.05$ vs control), en ninguno de los experimentos realizados y sólo se observa una diferencia significativa con las concentraciones de 10 y 100 μM . La estimulación en la producción de IPx con estas concentraciones varían entre los diferentes experimentos realizados, en un rango entre 8 y 60% (para 10 μM) y entre 80 y 160% (para 100 μM). Es por esto que se muestran los resultados de los experimentos independientes, además del promedio de todos estos (figura 4.2). El promedio de todos los experimentos de respuesta dependiente de la dosis se muestra como porcentajes sobre el nivel basal (control) de IPx. En esta gráfica también se observa que no hay un efecto significativo más que con las concentración de 100 μM . Con esta concentración de DA el promedio de estimulación observado en la producción de IPx fue de 135% +/- 30% sobre el control.

PRODUCCIÓN DE IPx EN RESPUESTA A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE DOPAMINA

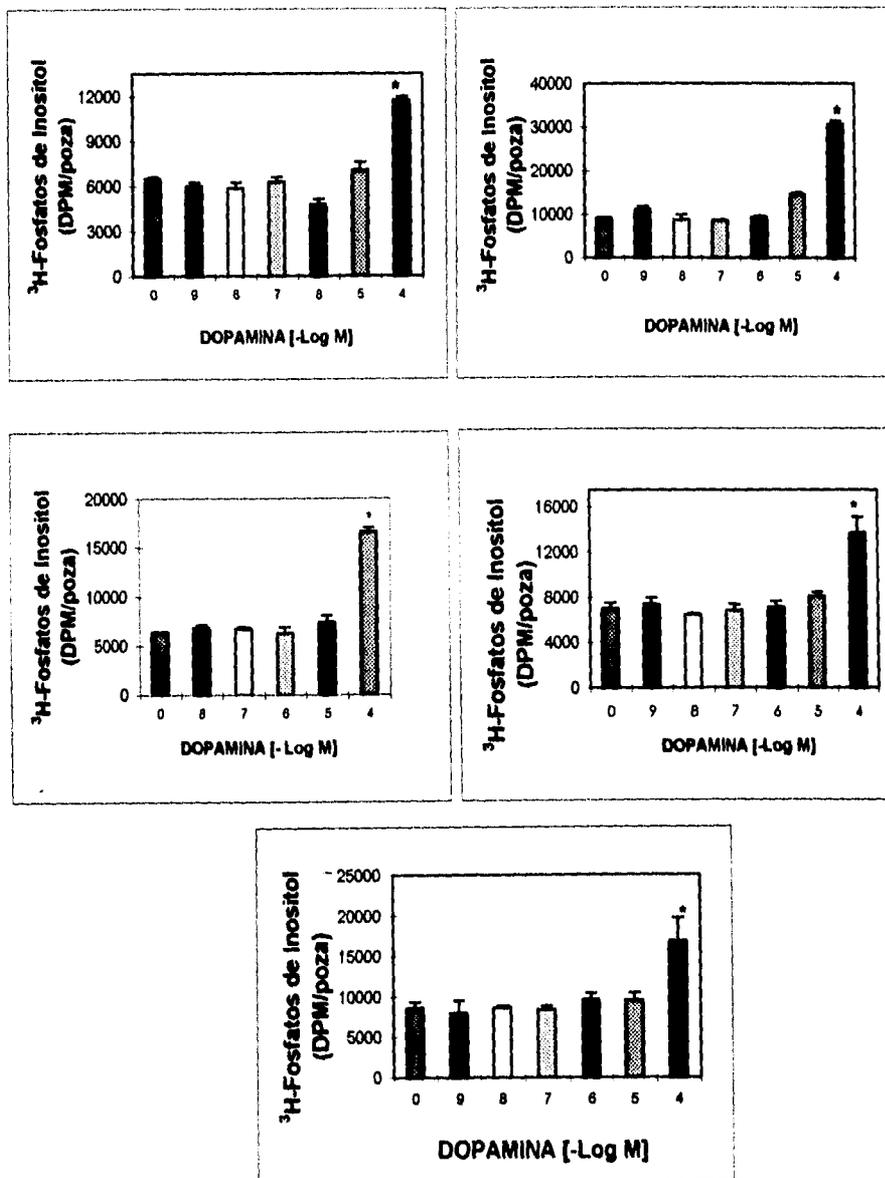


Figura 4.1. Relación dosis-respuesta de la producción de IPx en respuesta a dopamina en células GT1-1. Se muestran 5 experimentos independientes en los que cada tratamiento es el promedio de 3 réplicas +/- el error std.

* P<0.05 c/r al control.

**PRODUCCIÓN DE IPx EN RESPUESTA A
CONCENTRACIONES CRECIENTES DE
DOPAMINA
(PROMEDIO DE 5 EXPERIMENTOS)**

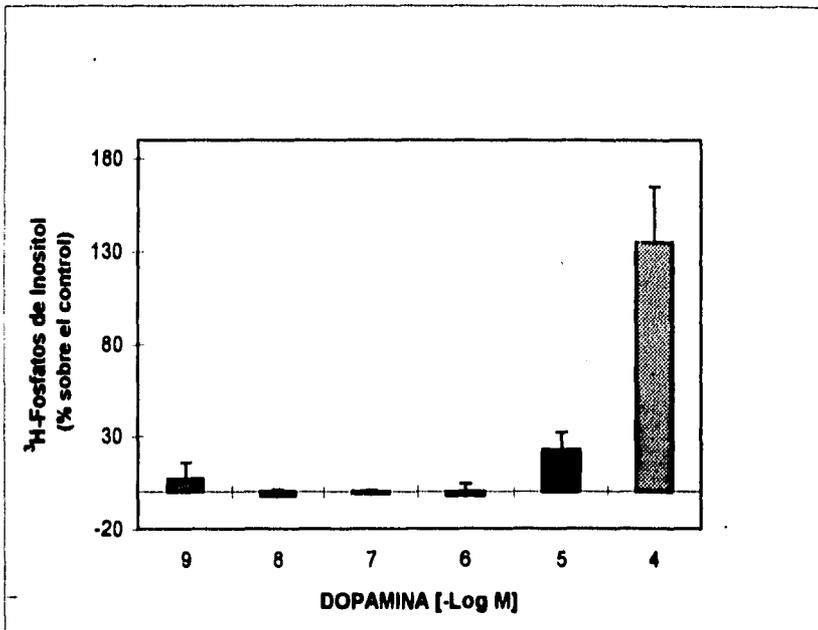


Figura 4.2. Relación dosis-respuesta de la producción de IPx en respuesta a dopamina. Se muestra el promedio de los 5 experimentos que aparecen en la figura 4.1 +/- el error std.

Con el objeto de disminuir la velocidad de oxidación de la DA en solución, en algunos experimentos se utilizó ácido ascórbico como vehículo antioxidante en las soluciones de DA. Por esta razón se realizaron también experimentos con el vehículo solo. La figura 4.3 muestra el efecto de diferentes concentraciones de ácido ascórbico sobre la producción de IPx. Como se puede observar, el ácido ascórbico 500 μ M (concentración presente en la solución de dopamina 100 μ M) presentó un efecto por sí mismo sobre la producción de IPx en las células GT1-1 de 90% +/- 10% sobre el control. Sin embargo, el efecto de la dopamina es auténtico, ya que en los experimentos en que se probó ésta sin el antioxidante (figura 4.4), se obtuvo una respuesta similar a la observada en los experimentos en que se adicionó ácido ascórbico. La dopamina 100 μ M sin ácido ascórbico presentó un aumento en la producción de IPx de 83% +/- 8% sobre el control.

La figura 4.5 muestra el curso temporal de la producción de fosfatos de inositol por las células GT1-1 en respuesta a dopamina 100 μ M. Se utilizó esta concentración ya que fue la que provocó una mayor producción de IPx en los experimentos de respuesta dependiente de la concentración. Se muestran los resultados de 4 experimentos independientes, ya que la estimulación sobre el control en cada uno presenta variabilidad. Sin embargo, se observa claramente en todos ellos que la respuesta es dependiente del tiempo, alcanzando un máximo (84% +/- 27%) aproximadamente a los 30 minutos, a partir de los cuales se establece una meseta. La figura 4.6 muestra el promedio de estos 4 experimentos de curso temporal. En esta figura se muestra la estimulación dopaminérgica de la producción de IPx como porcentajes sobre el control, y se observa que hay aumentos significativos (52% +/- 18%) en la producción IPx a partir de los 15 minutos de tratamiento.

PRODUCCIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL EN RESPUESTA A DOSIS CRECIENTES DE ÁCIDO ASCÓRBICO.

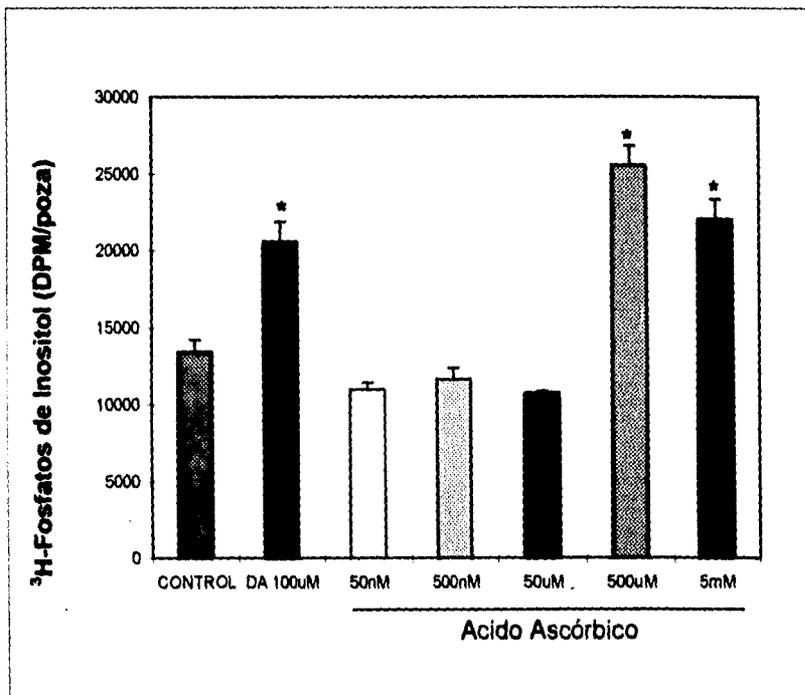


Figura 4.3. Efecto del ácido ascórbico sobre la producción de IPx en células GT1-1. Se muestra el promedio de 3 réplicas +/- el error std.

* $P < 0.05$ c/r al control.

FORMACIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL EN RESPUESTA A DOSIS CRECIENTES DE DOPAMINA EN AUSENCIA DE ÁCIDO ASCÓRBICO

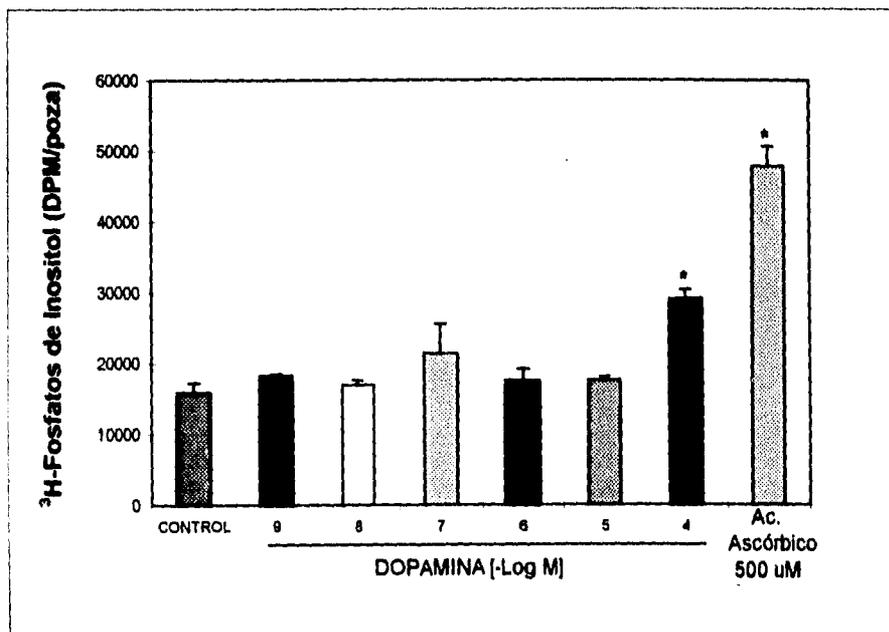


Figura 4.4. Producción de IPx en respuesta a concentraciones crecientes de DA sin ácido ascórbico. Se muestra el promedio de 3 réplicas +/- el error std.

* $P < 0.05$ c/r al control.

PRODUCCIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL EN RESPUESTA A DOPAMINA 100 μ M

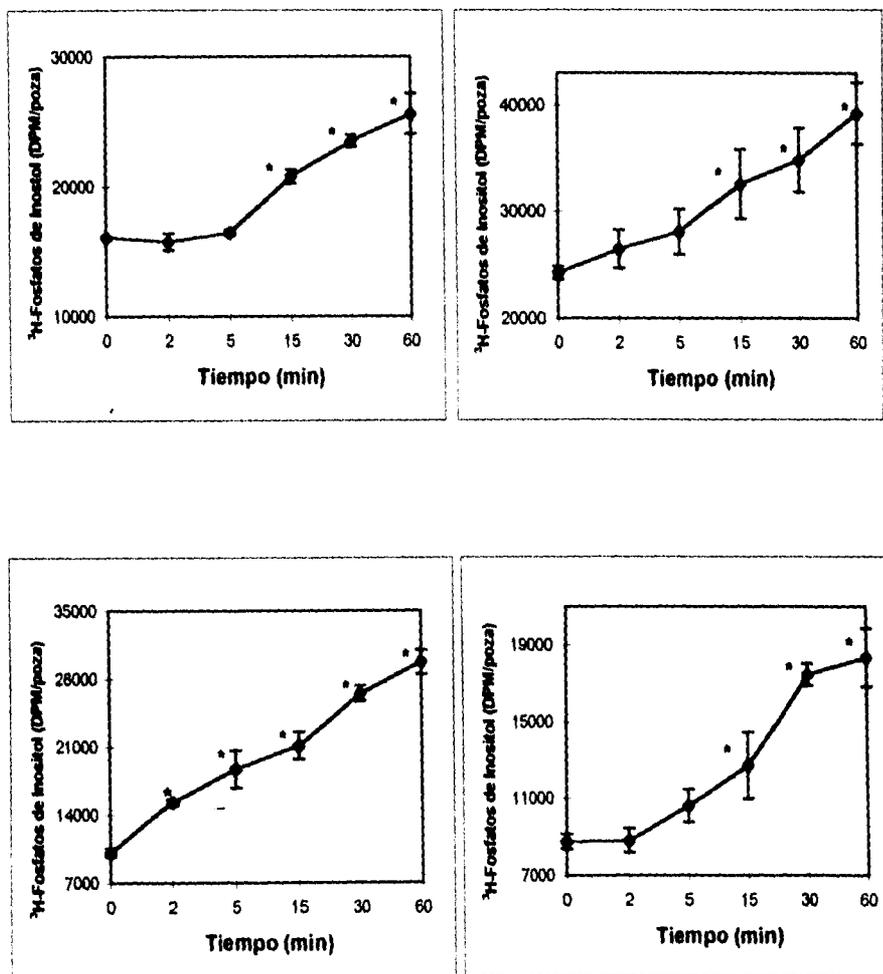


Figura 4.5. Curso temporal de la producción de IPx en respuesta a dopamina 100 μ M. Se muestran 4 experimentos independientes en los que cada resultado es el promedio de 3 réplicas +/- el error std. * P<0.05 c/r al control.

**PRODUCCIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL EN
RESPUESTA A DOPAMINA 100 μ M
(PROMEDIO DE 4 EXPERIMENTOS)**

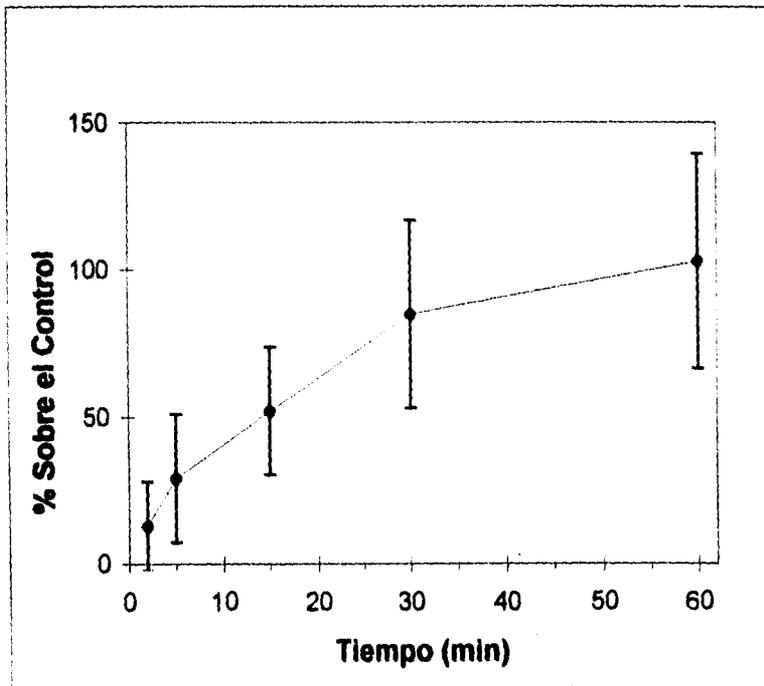


Figura 4.6. Curso temporal de la producción de IPx en respuesta a DA 100 μ M. Se muestra el promedio de 4 experimentos independientes +/- el error std.

-Efecto de la forskolina sobre la producción de IPx en células GT1-1.

Dado que la DA estimuló la producción de fosfatos de inositol con una baja potencia, es decir, fueron necesarias concentraciones altas ($100\mu\text{M}$) del neurotransmisor para observar dicha estimulación, y dado que la respuesta fue lenta, se planteó la posibilidad de que el efecto observado fuera secundario a la producción de otro segundo mensajero como el AMP cíclico. Con el fin de comprobar tal posibilidad, se estudió el efecto de la forskolina, un activador directo de la adenilato ciclasa, sobre la producción de IPx. Los resultados se muestran en la figura 4.7, en la que se observa que la forskolina no estimuló de manera significativa la producción de IPx en células GT1-1. Se muestran los resultados de dos experimentos en los que se probaron distintas concentraciones (1, 10 y $100\mu\text{M}$) de forskolina durante distintos tiempos (10 y 30 minutos).

-Efecto de agonistas D1 y D2 dopaminérgicos sobre la producción de IPx en células GT1-1.

Con el fin de investigar el tipo de receptor dopaminérgico que media el efecto de la dopamina sobre la producción de IPx, se probó la capacidad de los agonistas dopaminérgicos selectivos SKF-38393 (D1) y bromocriptina (D2) para estimular la producción de IPx. Se realizaron 2 experimentos de éste tipo, cuyos resultados aparecen en la figura 4.8. Como se observa en la gráfica, el SKF-38393 no estimuló significativamente la producción de IPx sobre el nivel basal en ninguna de las concentraciones probadas (3.9, 39 y $390\mu\text{M}$). La bromocriptina en la concentración más alta que se usó ($165\mu\text{M}$) produjo un aumento pequeño, aunque significativo ($26\% \pm 0.6\%$) en la producción de IPx. Sin embargo, este efecto no es comparable con el de la dopamina.

INEFICACIA DE LA FORSKOLINA PARA ESTIMULAR LA FORMACIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL EN LAS CÉLULAS GT1-1.

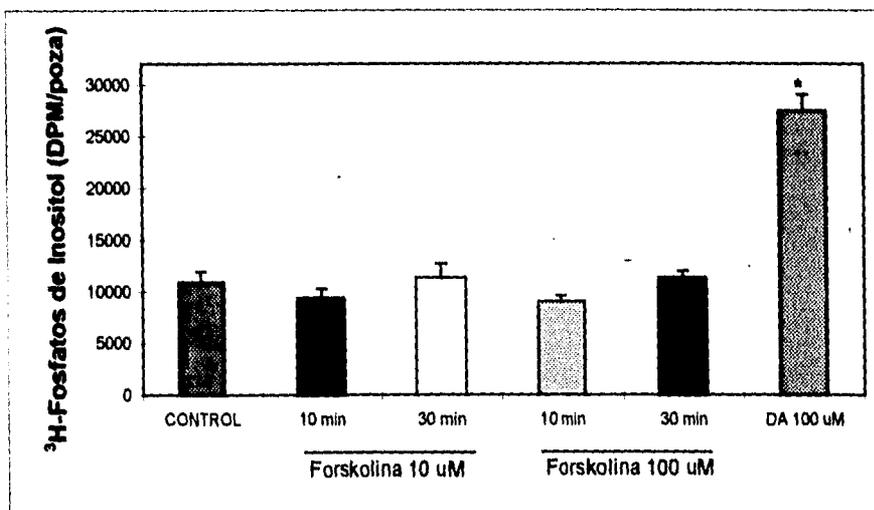
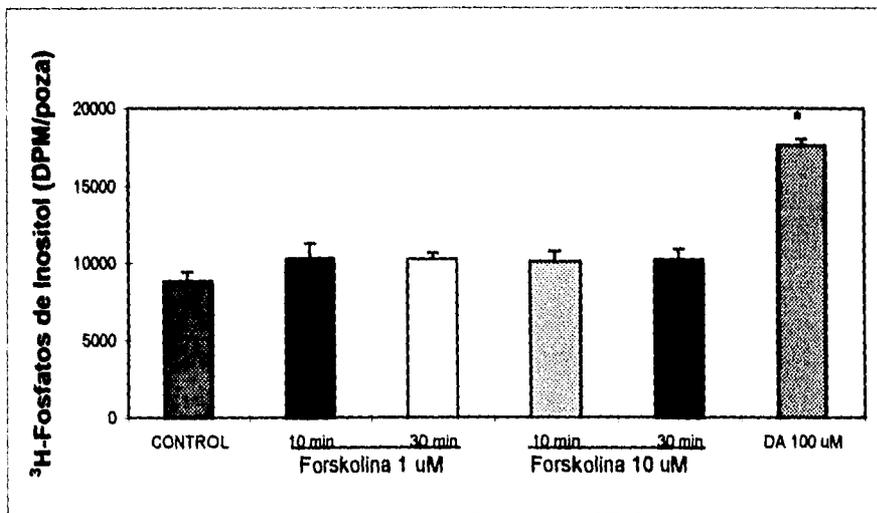


Figura 4.7. Efecto de la forskolina sobre la formación de IPx en células GT1-1. Se muestran 2 experimentos independientes en los que cada tratamiento es el promedio de 3 réplicas +/- el error std.

* $P < 0.05$ c/r al control.

PRODUCCIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL EN RESPUESTA A AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS SELECTIVOS DE RECEPTORES D1 Y D2

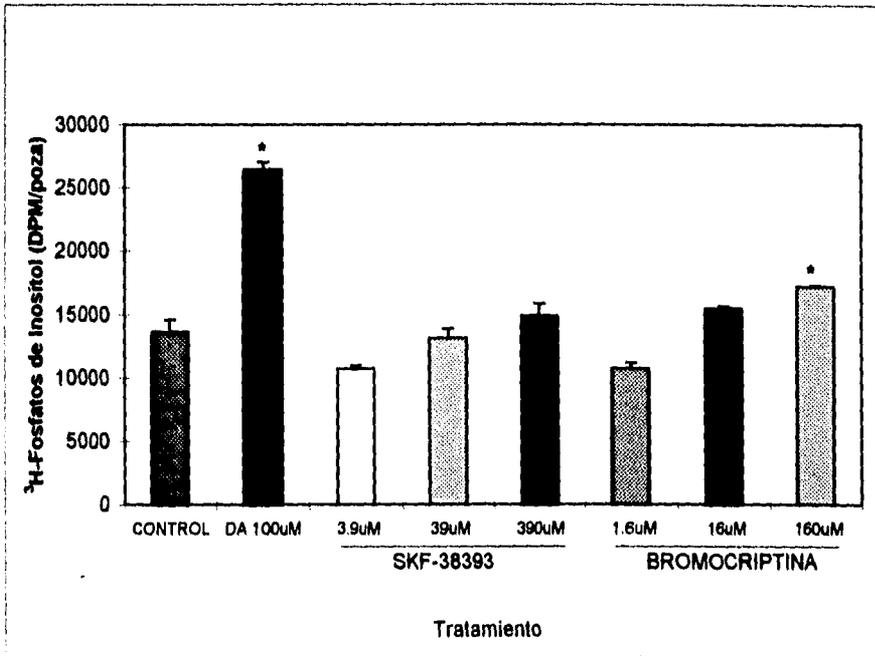


Figura 4-8- Efecto de los agonistas dopaminérgicos selectivos SKF-38393 (D1) y Bromocriptina (D2) sobre la producción de IPx. Se muestra el promedio de 3 réplicas +/- el error std.

* P<0.05 c/r al control.

-Efecto de antagonistas D1 y D2 dopaminérgicos sobre la estimulación dopaminérgica de la producción de IPx en células GT1-1.

Con el objeto de investigar el tipo de receptor dopaminérgico que media el efecto de la DA sobre la producción de fosfatos de inositol, se probaron las capacidades de los antagonistas selectivos SCH-23390 (D1) y spiroperidol (D2) para bloquear el efecto de la DA. Para ello, se aplicó cada uno de los antagonistas (0.01, 0.1 y 1 mM) simultáneamente con DA 100 μ M durante 30 minutos, y se midió la producción total de IPx con respecto al control. En estos experimentos se determinaron también los incrementos resultantes de la aplicación de DA 100 μ M en ausencia de antagonistas, como control interno.

Como se observa en la figura 4.9, ninguno de los antagonistas probados en las dosis mencionadas bloqueó completamente el efecto de la DA sobre la producción de IPx en los experimentos en que se utilizó ácido ascórbico como antioxidante. La dosis más baja que se utilizó en estos experimentos (10 μ M), parece tener un efecto de antagonista parcial en algunos de los experimentos que se muestran en la fig. 4.9, por lo que se decidió probar dosis más pequeñas del antagonista, ya que, además, la afinidad del receptor D2 por el spiroperidol es muy alta (0.08nM). Se probaron entonces concentraciones por debajo de 10 μ M, tanto en ausencia (figura 4.10) como en presencia (figura 4.11) de dopamina y con ácido ascórbico.

Como se observa en la figura 4.10, el spiroperidol en concentraciones menores a 10 μ M no tuvo ningún efecto por sí mismo sobre la producción de IPx, pero en dosis mayores (50 μ M), tuvo un efecto de agonista parcial sobre este sistema, estimulando en un 144% sobre el control la producción de IPx. Por otro lado, el spiroperidol en presencia de dopamina 100 μ M (figura 4.11) produjo un bloqueo parcial (de aproximadamente un 43%) del efecto de ésta sobre la producción de IPx con concentraciones entre 1 y 10 nM, pero no en concentraciones mayores, como se había observado en los experimentos anteriores.

EFFECTO DE ANTAGONISTAS DOPAMINÉRGICOS SELECTIVOS DE RECEPTORES D1 Y D2 SOBRE LA PRODUCCIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL EN 5 EXPERIMENTOS CON ÁCIDO ASCÓRBICO

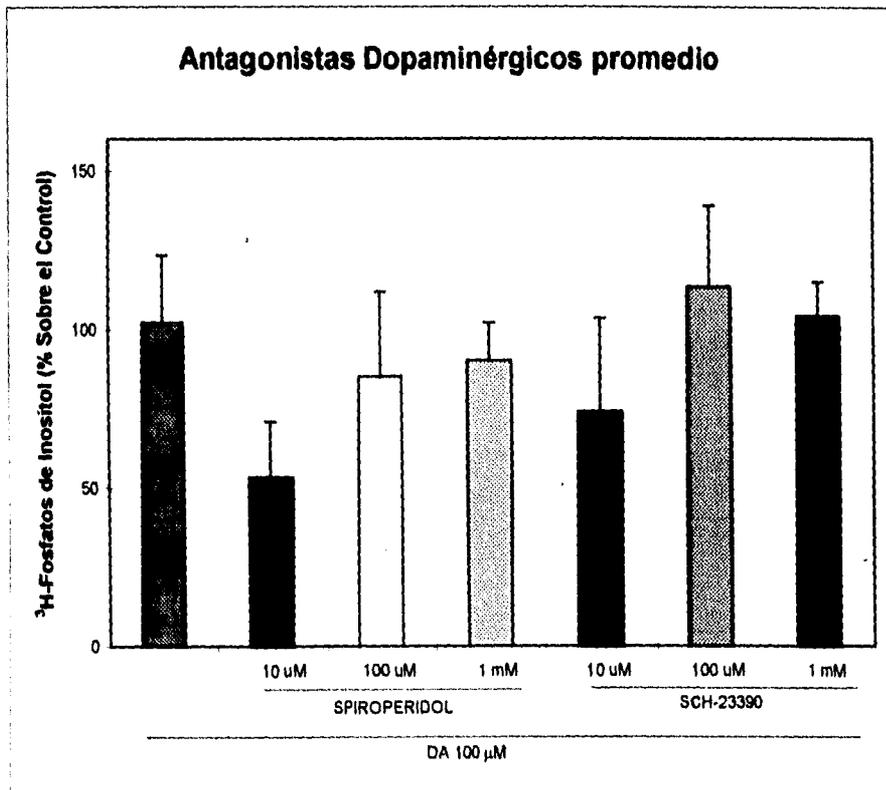


Figura 4.9. Efecto de los antagonistas dopaminérgicos selectivos SCH-23390 (D1) y Spiroperidol (D2) sobre la producción de IPx en respuesta a DA 100 μ M. Se muestra el promedio de 5 experimentos, cada uno por triplicado \pm el error std.

**FORMACIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL EN RESPUESTA
A DOSIS CRECIENTES DEL ANTAGONISTA D2
SPIROPERIDOL EN AUSENCIA DE DOPAMINA**

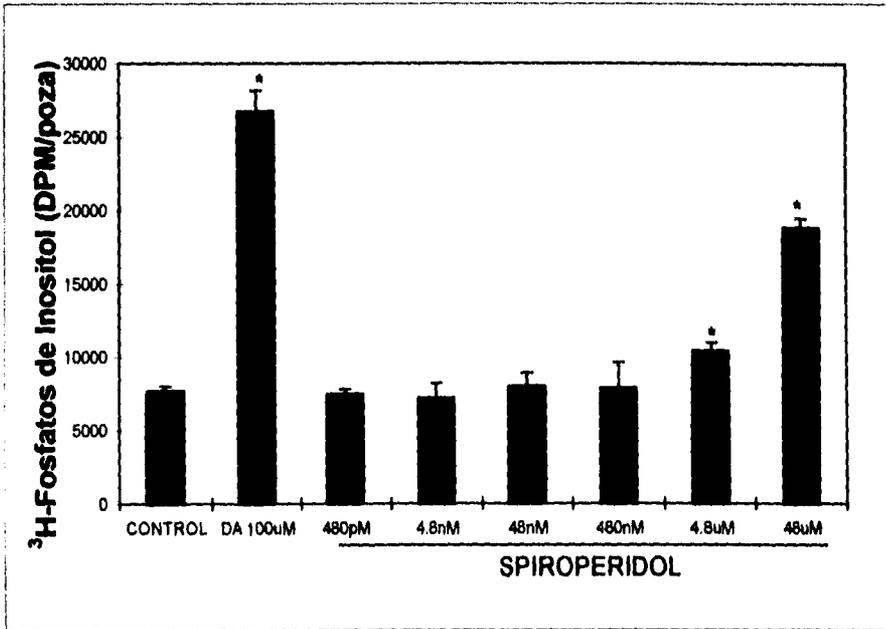


Figura 4.10. Efecto del spiroperidol sobre la formación de IPx en células GT1-1. Se muestra el promedio de 3 réplicas +/- el error std.
* P<0.05 c/r al control.

**EFFECTO DEL ANTAGONISTA D2 SPIROPERIDOL EN
CONCENTRACIONES MENORES A 10 μ M SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE IPx EN RESPUESTA A DOPAMINA EN
PRESENCIA DE ACIDO ASCORBICO**

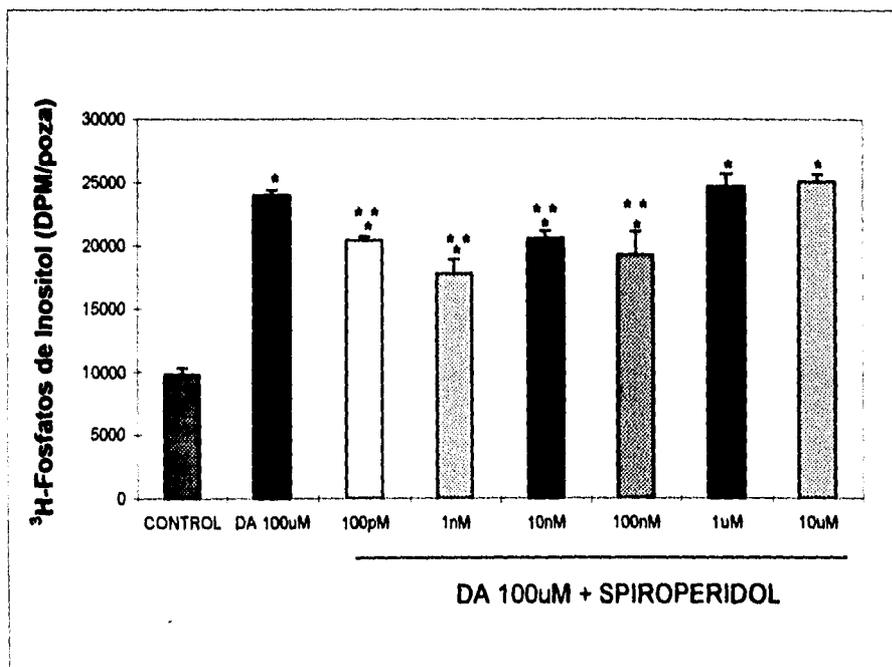


Figura 4.11. Efecto del antagonista D2 Spiroperidol sobre la producción de IPx en respuesta a DA en presencia de ácido ascórbico. Se muestra el promedio de 3 réplicas +/- el error std.

* $P < 0.05$ c/r al control. ** $P < 0.05$ c/r al tratamiento con DA

sin embargo, dado que el ácido ascórbico presentó un efecto por sí mismo sobre la producción de IPx, era posible que la ausencia de antagonismo se debiera a que los antagonistas utilizados no bloqueaban el efecto de éste. Se realizaron entonces experimentos de competencia de la DA con sus antagonistas, en ausencia del antioxidante. Los resultados de éstos experimentos se muestran en la figura 4.12. Se observa claramente una inhibición del efecto de la dopamina con dosis pequeñas de spiroperidol (500nM), mientras que con dosis altas este antagonista presenta un efecto de agonista parcial. Por su parte el SCH-23390 fue también capaz de bloquear el efecto de la DA, pero únicamente en dosis altas (70µM), mientras que con dosis menores no tuvo efecto sobre la producción de IPx en respuesta a dopamina.

-Efecto de antagonistas H1 histaminérgico, α y β adrenérgicos sobre la estimulación dopaminérgica de la producción de IPx.

Para comprobar la especificidad de la acción de la dopamina sobre los receptores dopaminérgicos mencionados, se probó la ausencia de antagonismo selectivo de otros tipos de receptores que podrían estar mediando el efecto en caso de no ser específico de receptores dopaminérgicos. Una posibilidad podrían ser los receptores histaminérgicos H1, que se sabe están acoplados a la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos (Noris et al., en prensa), o bien algún receptor adrenérgico, ya que la estructura de éstos es muy similar a la de los dopaminérgicos, y hay receptores α adrenérgicos acoplados a esta vía de señalización intracelular (Marx, 1987).

La figura 4.13 muestra el efecto del antagonista H1 clorfeniramina sobre la producción de fosfatos de inositol en células GT1-1. Se decidió utilizar este antagonista ya que en estudios previos se había observado que otros antagonistas H1 (pirilalmina, triprolidina) producían un efecto agonista a

**EFFECTO DE ANTAGONISTAS D1 Y D2 DOPAMINÉRGICOS
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL
EN RESPUESTA A DOPAMINA SIN ÁCIDO ASCÓRBICO.**

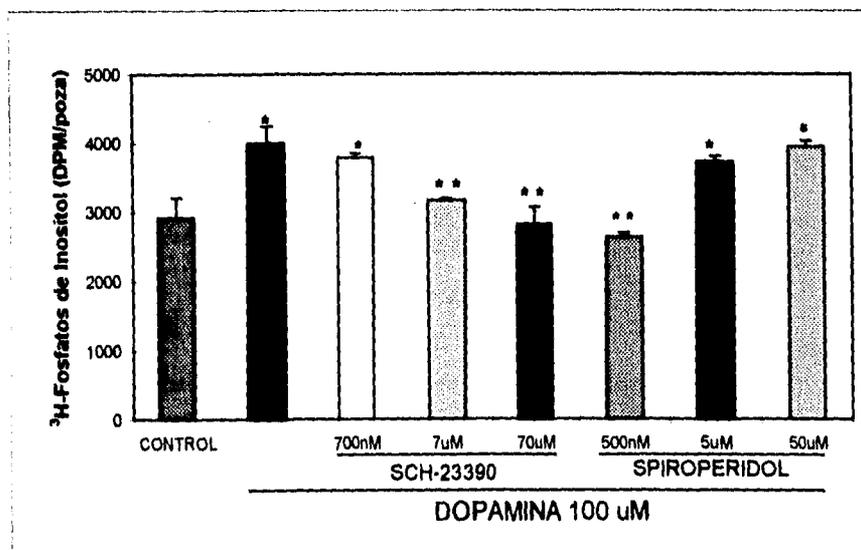
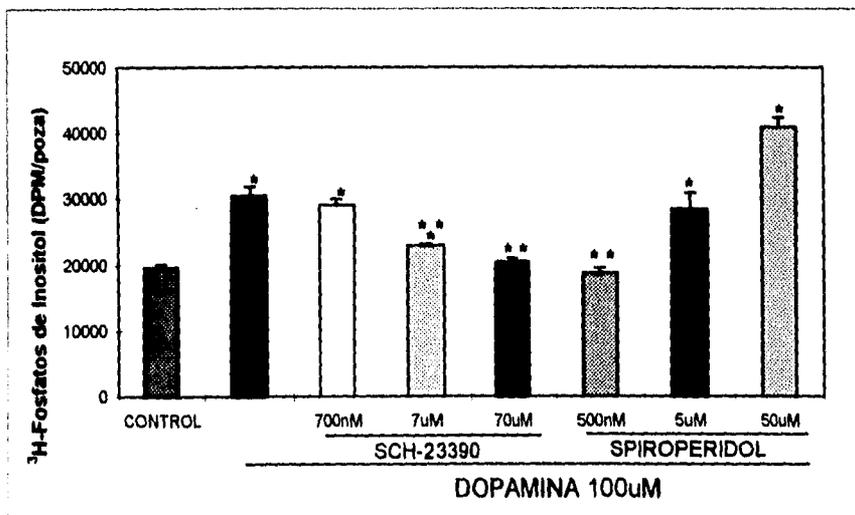


Figura 4.12. Efecto de los antagonistas dopaminérgicos SCH-23390 (D1) y spiroperidol (D2) sobre la producción de IPx en respuesta a DA 100 μM sin Ac. Ascórbico en 2 exp. independientes.

* P<0.05 c/r al control. ** P<0.05 c/r al tratamiento con DA.

concentraciones elevadas ($100\mu\text{M}$) y la clorfeniramina no presenta éste efecto (ver Hol, 1994). Como se ve en la figura 4.13, la clorfeniramina no bloqueó el efecto de la DA sobre la producción de IPx.

En la figura 4.14 se observa que los antagonistas adrenérgicos fentolamina (α) y propranolol (β) tampoco bloquean la estimulación dopaminérgica de la producción de IPx.

AUSENCIA DE ANTAGONISMO SELECTIVO DE RECEPTOR H1 HISTAMINÉRGICOS EN EL EFECTO DE LA DOPAMINA 100 SOBRE FOSFATOS DE INOSITOL.

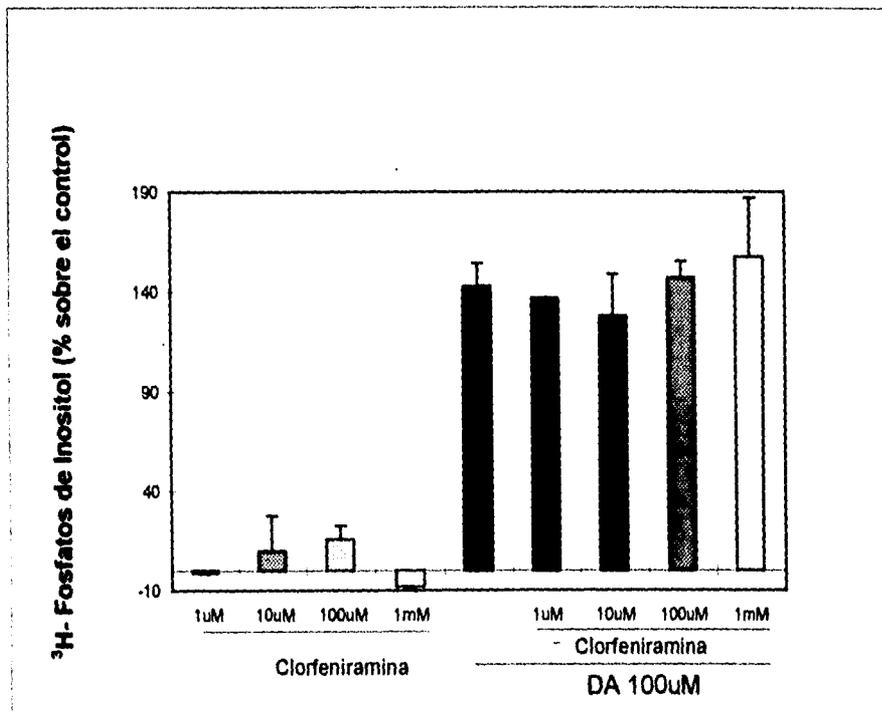


Figura 4.13. Efecto del antagonista H1 histaminérgico clorfeniramina sobre la producción de IPx tanto basal como en respuesta a DA 100uM. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes cada uno por triplicado +/- el error std.

**AUSENCIA DE ANTAGONISMO SELECTIVO DE RECEPTORES
 α Y β ADRENÉRGICOS EN EL EFECTO DE LA DOPAMINA
SOBRE FOSFATOS DE INOSITOL.**

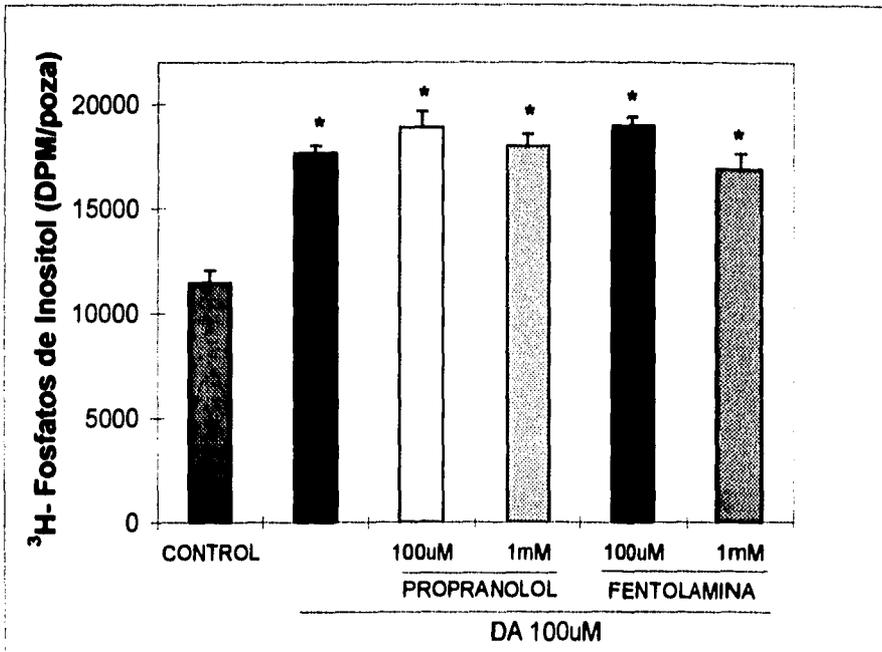


Figura 4.14. Efecto de los antagonistas adrenérgicos fentolamina y propranolol sobre la producción de IPx en respuesta a DA 100 uM. Se muestra el promedio de 3 réplicas +/- el error std.

* $P < 0.05$ c/r al control.

5. DISCUSIÓN.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la dopamina afecta el recambio de fosfoinosítidos en neuronas GnRHérgicas inmortalizadas, así como, de existir este efecto, determinar si podría explicar el hecho de que hay una diferencia entre la eficacia de la DA y la NE para facilitar la producción de AMP cíclico siendo que ambas estimulan con igual eficacia la secreción de GnRH. Esto, como se planteó, se podría explicar si la dopamina inhibiera alguna vía de transducción intracelular, como puede ser la producción de fosfatos de inositol, que se sabe están involucrados en la secreción de GnRH inducida por algunos neurotransmisores como la endotelina (Krsmanovic et al., 1991) y la histamina (Noris et al., en prensa), o bien si la NE estimulara la producción de éstos u otros segundos mensajeros con un efecto sumatorio al de la producción de AMP cíclico. De acuerdo a los resultados obtenidos, la estimulación de la producción de fosfatos de inositol por la dopamina en células GT1-1 no explica entonces estas discrepancias.

El efecto de la dopamina sobre la producción de IPx en las células GT1-1 no parece tener un significado fisiológico en cuanto a la participación de estos segundos mensajeros en la secreción de GnRH facilitada por DA, ya que la DA mostró un efecto significativo sobre este sistema únicamente en dosis mucho mayores (100 veces) que aquellas con las que se obtiene una respuesta máxima sobre la secreción de GnRH. El efecto de la DA sobre IPx parece ser mediado por receptores de tipo D2, como sugieren los datos correspondientes a los experimentos con antagonistas dopaminérgicos, en los que la respuesta a la DA fue bloqueada por spiroperidol, un antagonista selectivo de éste tipo de receptores, en una concentración pequeña (700nM) con respecto a la concentración de DA aplicada. Por otro lado el antagonista de receptores D1 SCH-23390 fue capaz de bloquear dicho efecto únicamente en dosis altas (50µM). Sin embargo, la baja potencia del agonista D2 bromocriptina para

estimular la producción de IPx, aunada a la baja potencia de la dopamina para ejercer este efecto, sugiere que los receptores D2 que podrían mediar este efecto están acoplados con una baja eficiencia a la transducción de las señales intracelulares. Esto podría ser producto de un defecto en el receptor por tratarse de células transformadas, o bien de una baja eficacia de acoplamiento provocada por algún defecto en el funcionamiento de las proteínas G involucradas. Finalmente no podemos descartar la posibilidad de que la fosfolipasa C en estas células funcionara deficientemente, aunque esto es poco probable, ya que por otros estudios de este tipo realizados en células GT1-1, la producción de IPx no parece ocurrir de manera anómala.

Alternativamente, el efecto de la dopamina sobre la producción de IPx podría ser un efecto inespecífico ya sea a través de otro(s) tipo(s) de receptores, o bien un efecto no mediado por receptores, por ejemplo un efecto causado por las propiedades reductoras de este neurotransmisor, al encontrarse en una alta concentración (100 μ M) en el medio extracelular.

En los experimentos de respuesta dependiente de la dosis, la dopamina estimuló la producción de IPx únicamente con una concentración de 100 μ M. Esto representa una muy baja potencia con respecto a la que tiene la DA sobre la secreción de GnRH, la cual presenta respuestas máximas con una concentración de 1 μ M. Ya que la secreción se da en respuesta a concentraciones mucho menores de DA que las capaces de producir un aumento en la producción de fosfatos de inositol, esto es un argumento sólido que sustenta la idea de que la producción de IPx no está involucrada en la estimulación dopaminérgica de la secreción de GnRH.

En cuanto al curso temporal del efecto de la DA sobre la producción de IPx, se empiezan a observar incrementos significativos a partir de los 15 minutos de tratamiento, y el efecto aumenta con el tiempo, comenzando a establecer una meseta aproximadamente a partir de los 30 minutos, es decir, entre este tiempo y los 60 minutos, el incremento se hace menor.

Hay dos formas de medir las variaciones temporales de una respuesta biológica: una es analizar el recambio de la sustancia que se estudia, midiendo la cantidad de ésta presente en momentos determinados (el equivalente de la derivada de una función matemática), y otra es medir la acumulación de dicha sustancia en el medio, a diferentes tiempos (el equivalente de la integral de una función). Lo que se midió en nuestros estudios de curso temporal fué la acumulación de los IPx producidos, ya que los experimentos fueron realizados en cultivos estáticos, y por lo tanto cada dato representa la cantidad de IPx acumulada durante el tiempo anterior mas la producida en el intervalo entre aquel y el tiempo actual, y no la tasa de recambio de los IPx. Por lo tanto, los cambios pequeños que podrían tener una importancia fisiológica no necesariamente pueden ser detectados en el momento en que ocurren, sino con cierto retraso. Esto hace que la sensibilidad del método no sea muy alta, y por lo tanto no podemos afirmar que no hay cambios fisiologicamente significativos antes de los 15 o 30 minutos. El hecho de que haya un incremento aproximadamente lineal hasta los 30 minutos y después el aumento sea menor entre este tiempo y los 60 minutos, indica que al menos durante los primeros 30 minutos, el receptor que media el efecto de la dopamina sigue respondiendo al estímulo, y empieza a desensibilizarse a partir de éste tiempo. Se sabe que hay una desensibilización de los receptores dopaminérgicos, por lo menos los D1, cuando son expuestos durante tiempos prolongados a agonistas (Martínez de la Escalera et al., 1992 b). Aunque este tipo de experimentos en los que se mide acumulación no se pueden comparar directamente con aquellos en los cuales se analizan las tasas de recambio, y no necesariamente detectan cambios fisiologicamente relevantes en el momento en que se producen, podríamos decir que el efecto de la dopamina sobre el sistema de IPx es tardío con respecto al efecto sobre la secreción de GnRH, el cual se observa pocos minutos (2-5) después de la adición de la dopamina al cultivo (Martínez de la Escalera et al., 1992 b). Este resultado, aunque de forma indirecta, apoya también la conclusión

de que la producción de IPx no está involucrada en la estimulación dopaminérgica de la secreción de GnRH.

Aunque en los experimentos en que probamos la acción del vehículo (ácido ascórbico), -utilizado para disminuir la velocidad de oxidación de la dopamina-, se observó un incremento significativo del 155% sobre el control en la producción de IPx por acción del antioxidante (en la concentración de ácido ascórbico utilizada con 100 μ M de DA, es decir 500 μ M), el efecto de la dopamina es auténtico, ya que la DA sola tuvo también un efecto significativo (84% con 500 μ M y 46% con 100 μ M) sobre la producción de IPx. Se sabe que el ácido ascórbico tiene una gran cantidad de efectos biológicos relacionados con la secreción, la regulación de algunos receptores, etc. Por ejemplo, en estudios de unión de ligandos dopaminérgicos, el ácido ascórbico inhibe la unión tanto de agonistas como de antagonistas a receptores dopaminérgicos (para revisión ver Rebec y Pierce, 1994). La naturaleza de esta inhibición es diferente para estos dos tipos de ligandos. La inhibición del pegado de los agonistas parece ser alostérica mientras que en el caso de los antagonistas parece haber una destrucción del sitio de unión por una peroxidación de lípidos de la membrana dependiente de hierro. Esto sin embargo, se ha observado sólo en tejidos homogeneizados, mientras que las células intactas resisten este proceso, por lo que es poco probable que esto haya ocurrido en nuestros estudios. Dado que los antagonistas dopaminérgicos no fueron capaces de bloquear el efecto en los experimentos con ácido ascórbico, éste no parece actuar a través de receptores dopaminérgicos clásicos. Además, el ácido ascórbico tuvo un efecto sobre la producción de IPx únicamente en concentraciones de 500 μ M, pero no con 100 μ M o menores, lo que sugiere que este efecto probablemente no tenga un significado fisiológico.

Los efectos de la dopamina y el antioxidante juntos no son aditivos. Esto sugiere o bien que el ácido ascórbico impide la unión de la dopamina a sus receptores y ejerce un efecto por sí mismo (lo cual, como se explicó no parece ser el caso), o bien que ambos utilizan la misma vía de estimulación de la

hidrólisis de fosfoinosítidos. El efecto podría ser debido, por ejemplo, a la acción reductora de éstas dos sustancias, y es consistente con la idea de que la acción de la dopamina no fuera mediada por un receptor. Sin embargo, dado que el efecto de la DA sola fué bloqueado por antagonistas dopaminérgicos y el del ácido ascórbico no, es poco probable que esta vía explique la acción de la dopamina en el sistema analizado.

Otra posibilidad sería que la producción de IPx fuera un efecto secundario a la formación de otro segundo mensajero, como el AMP cíclico, cuya producción es estimulada por dosis pequeñas de dopamina ($1\mu\text{M}$). Para analizar esta posibilidad, se probó si la forskolina, un potente activador de la adenilato ciclasa, era capaz de estimular la producción de IPx. Sin embargo, la estimulación de la adenilato ciclasa con forskolina no tuvo ningún efecto sobre la producción de IPx, lo cual sugiere que el efecto de la DA sobre este sistema no es ejercido a través de la producción de AMP cíclico, sino directamente a través de algún receptor, o por alguna otra vía.

Con el objeto de encontrar el tipo de receptor que media el efecto, se utilizaron agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos D1 y D2. El SCH-23390 es un antagonista con una afinidad por los receptores D1 y D5 similar a la de la DA por estos, y es un orden de magnitud más potente sobre estos receptores que sobre los D2, D3 y D4. El spiroperidol es un antagonista de 3 a 4 órdenes de magnitud más potente sobre receptores D2, D3 y D4 que sobre los D1 y D5 y casi 2 órdenes de magnitud más potente que la DA sobre los receptores D2 y D3 (Peroutka, 1994).

En experimentos en los que se utilizaron estos antagonistas en presencia de dopamina sin ácido ascórbico, el spiroperidol en una concentración de 500nM fue capaz de bloquear completamente el efecto de la DA $100\mu\text{M}$, lo cual es un argumento que sugiere la participación de receptores de tipo D2 en la mediación del efecto de la DA sobre IPx. Por otro lado, el spiroperidol en dosis más altas ($50\mu\text{M}$) no bloqueó el efecto de la DA. Esto podría explicarse con un

efecto de agonista parcial del spiroperidol. En forma consistente, en experimentos en los que se probó spiroperidol solo, se observó un efecto estimulante de este fármaco sobre la producción de IPx con dosis de $48\mu\text{M}$. Por su parte, el agonista de receptores de tipo D2 bromocriptina estimuló ligeramente la producción de IPx, lo que también sugiere la participación de éste tipo de receptor en el efecto de la DA sobre IPx. Sin embargo el efecto de la bromocriptina fue mucho menor que el de la DA. Hay que tomar en cuenta que la bromocriptina no es muy soluble en agua, y por lo tanto se podría atribuir esta falta de efecto a la precipitación del fármaco en el medio de cultivo. Sin embargo, dada la alta concentración de bromocriptina utilizada y la elevada afinidad del receptor D2 por éste fármaco, se podía esperar que aunque sólo un pequeño porcentaje de ésta estuviera disuelto, esto fuera suficiente para observar un efecto. Esto, aunado a la baja potencia de la DA para estimular la producción de IPx, podría sugerir la intervención de un receptor de tipo D2 pero con un acoplamiento poco eficiente a la transducción intracelular de la señal.

Por otro lado, el antagonista selectivo de receptores D1 SCH-23390, bloqueó también el efecto de la DA sobre IPx, pero únicamente en concentraciones altas ($70\mu\text{M}$), lo cual habla de un efecto inespecífico, ya que la constante de afinidad del receptor D1 por este antagonista es mucho menor. Además, el agonista D1 SKF-38393 no tuvo ningún efecto sobre la producción de IPx, lo cual descarta la posibilidad de que la DA ejerciera el efecto observado a través de éste tipo de receptor.

En conjunto, estos resultados sugieren que el efecto estimulador de la DA sobre la producción de IPx es mediado por receptores dopaminérgicos de tipo D2, acoplados con baja eficiencia a la transducción de señales intracelulares.

Se ha reportado generalmente que el receptor D1 está acoplado positivamente a la producción de AMP cíclico (Sibley, 1991; Monsma et al., 1990), y casi nunca al sistema de recambio de fosfoinosítidos, aunque puede acoplarse

también a éste mecanismo de señalización en algunos modelos experimentales, como por ejemplo en ovocitos de *Xenopus laevis* (Mahan et al., 1989) o en el túbulo proximal del riñón (Felder et al., 1989). Como las células GT1-1 son células transformadas, no se puede excluir la posibilidad de que ocurriera un acoplamiento similar de éste receptor, sin embargo nuestros resultados sugieren que no es éste receptor el que media el efecto de la DA en el sistema de producción de IPx. El receptor D2 se describe generalmente como un receptor "inhibidor", ya que en general se encuentra acoplado negativamente tanto a la producción de AMP cíclico -a través de una proteína G sensible a la toxina de pertussis, del tipo Gi/Go (Bunzow et al., 1988)- como a la liberación de calcio dependiente de IP3 (Vallar y Meldolesi, 1989), por lo que no es de esperarse encontrarlo estimulando la producción de IPx, aunque existe la posibilidad de que en las neuronas GnRHérgicas este receptor se acoplara de manera distinta a las vías de señalización intracelular. Por otro lado, no se puede descartar la posibilidad de que en un modelo transformado como son las células GT1 el acoplamiento de los receptores fuera distinto al que se encuentra normalmente en las células GnRHérgicas. El receptor D3 por otra parte, se acopla en general negativamente a la adenilato ciclasa, pero a través de una proteína G diferente de la que acopla al receptor tipo D2 (Sibley, 1991), y no se ha descrito que se acople a la vía de hidrólisis de fosoinositidos. El receptor de tipo D4 inhibe también a la adenilato ciclasa a través de una proteína G del tipo de las acopladas al receptor D2 (Cohen et al., 1992). Finalmente el receptor D5 tiene una farmacología muy similar a la del receptor D1, y como éste, se acopla a la activación de la adenilato ciclasa a través de proteínas Gs (Watson y Arkininstall, 1994), pero no se ha descrito su acoplamiento al sistema de recambio de fosoinositidos. Esto aunado a la ineficacia del SCH-23390 (el cual tiene una afinidad alta por el receptor D5, parecida a la que tiene por el D1) para bloquear el efecto de la dopamina en concentraciones cercanas a su constante de afinidad, hacen poco probable que receptores de tipo D5 participen en la estimulación dopaminérgica de la producción de IPx. El receptor de tipo D2,

entonces, es el receptor dopaminérgico que podría mediar mas probablemente el efecto observado en nuestros experimentos, ya que se ha descrito que se acopla a la vía de hidrólisis de fosfoinosítidos, aunque como ya se ha dicho, se ha descrito un acoplamiento negativo a éste sistema. Sin embargo, no se puede descartar, como se dijo, la posibilidad de que en un modelo celular transformado como son las células GT1-1 se acoplara de distinta manera a los mecanismos de transducción intracelular.

En resumen, la estimulación dopaminérgica de la producción de IPx no parece explicar las observaciones de que la dopamina estimula la producción de AMP cíclico al doble de lo que lo hace la norepinefrina cuando ambas estimulan la secreción de GnRH con una eficacia similar. Este efecto, como se dijo, podría ser explicado si la DA inhibiera a alguna vía de señalización intracelular, disminuyendo así el efecto que tiene mediado por AMP cíclico, o bien si la NE estimulara alguna vía de señalización produciendo un efecto sumatorio al del AMP cíclico. El hecho de que la DA estimule la producción de IPx no explica entonces estas observaciones. Otra posibilidad para explicar este fenómeno, sería que la cantidad de AMP cíclico producido por la NE sea suficiente para tener una secreción máxima de GnRH, y el efecto de la DA induciendo la formación de una cantidad mayor de AMP cíclico no se reflejase en la secreción de GnRH. La producción de fosfatos de inositol, no parece entonces estar involucrada en la estimulación dopaminérgica de la secreción de GnRH, ni explica las diferencias en la producción de AMP cíclico observadas en respuesta a DA y NE en las células GT1-1.

REFERENCIAS.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. D. Watson, 1994. *Molecular biology of the Cell*. 3a ed. Garland Publishing, Inc. New York.

Arnold, M.A. y J.B. Martin, 1989. Central control of anterior pituitary function. En: Trendelenburg, U y N. Weiner (eds) "Catecholamines II" Springer-Verlag, Berlin. pp. 89-136.

Barracough, C.A. y P.M. Wise. 1982. The role of catecholamines in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocrine Reviews*. Vol 3 (1): 91-119.

Beck, V., J.L.Hancke y W. Wuttke, 1978. Increased sensitivity of dopaminergic inhibition of luteinizing hormone release in immature and castrated female rats. *Endocrinology* 102: 837-843.

Berridge, M. J., 1987. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem* 56: 159-193.

Björklund, A., O. Lindvall, y A. Nobin, 1975. Evidence of an incerto-hypothalamic dopamine neurone system in the rat. *Brain Research*, 89: 29-42.

Blake, C.A: 1976. Effects of intravenous infusion of catecholamines on rat plasma luteinizing hormone and prolactin concentrations. *Endocrinology* 98: 99-104.

Bloom, F.E., J.A. Schulman y G.F. Koob, 1989. Catecholamines and behaviour. En: Trendelenburg, U. y N. Weiner (eds) "Catecholamines II". Springer-Verlag, Berlin. pp. 27-88.

Boesgaard, S, C. Hagen, J. Hangaard, A.N. Andersen y E. Eldrup. 1991. Pulsatile gonadotropin secretion and basal prolactin levels during dopamine D-1 receptor stimulation in normal women. *Fert-Ster* 55(2): 281-286.

Bunzow, J. R., H.H.M. Van Tol, D.K. Grandy, P. Albert, J. Salon, M. Christie, C.A. Machida, K. A. Neve y O. Civelli, 1988. Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature*, 336: 783-787.

Carmel, P.W., S. Araki y M. Ferin, 1976. Pituitary stalk portal blood collection in Rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of Gonadotropin-Releasing hormone (GnRH). *Endocrinology* 99: 243-248.

Choudhury, S.A.R., R.M. Sharpe y P.S. Brown, 1974. The effect of pimozide, a dopamine antagonist, on pituitary gonadotrophic function in the rat. *J. Reprod. Fert.* 39: 275-283.

Clarke, I.J. y J.T. Cummins, 1982. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and Luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111: 1737-1739.

Clemens, J. A., F.C. Tinsley y R. W. Fuller, 1977. Evidence for a Dopaminergic component in the series of neural events that lead to the pro-oestrous surge of LH. *Acta endocrinologica (Copenh)* 85: 18-24.

Cohen, A.I. 1992. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 12093-12097.

Drouva, S.V. y R. Gallo, 1976. Catecholamine involvement in episodic luteinizing hormone release in adult ovariectomized rats. *Endocrinology* 99: 651-658.

Drouva, V. y R. Gallo, 1977. Further evidence for inhibition of episodic luteinizing hormone release in ovariectomized rats by stimulation of dopamine receptors. *Endocrinology* 100: 792-798.

Felder, R.A., C.C. Felder, G.M. Eisner y P.A. Jose, 1989. The dopamine receptor in adult and maturing kidney. *Am. J. Physiol.* 257 (3): F315-F327.

Findell, P. R., K. H. Wong, J.K. Jackman y D.V. Daniels, 1993. b1-Adrenergic and Dopamine (D1)-Receptors coupled to adenylyl cyclase activation in GT1 Gonadotropin-releasing hormone neurosecretory cells. *Endocrinology*, 132: 682-688.

Fink, G. 1988. "Gonadotropin secretion and its control" En: Knobil E. y Neill J. (eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press Ltd., N.Y. pp 1349-1377.

Gallo, R.V. y S. V. Drouva, 1979. Effect of intraventricular infusion of catecholamines on luteinizing hormone release in ovariectomized and ovariectomized, steroid-primed rats. *Neuroendocrinology* 29: 149-162.

Hol, D., 1994. "Producción de fosfatos de inositol en respuesta a histamina en la línea neuronal hipotalámica GT1-1". Tesis prof. IIB, UNAM.

Jarjour, L.T., E.J. Handelsman, W.J.Raum y R. S. Swerdloff, 1986. Mechanisms of action of dopamine on the *in vitro* release of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 119: 1726-1732.

Jennes, L, W.E. Stumpf y M.L Tappaz, 1983. Anatomical relationships of dopaminergic and GABAergic systems with the GnRH-systems in the Septo-hypothalamic area. *Exp. Brain. Res.* 50: 91-99.

Judd, S.J., J.S. Rakoff y S.S.C. Yen, 1978. Inhibition of gonadotropin and prolactin release by dopamine: Effect of endogenous estradiol levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47: 494-498.

Kamberi, I.A., R.S. Mical y J.C. Porter. 1970. Effect of anterior pituitary perfusion and intraventricular injection of catecholamines and indoleamines on LH release. *Endocrinology* 87: 1-12.

Kaufman, J-M. J.S. Kesner, R.C. Wilson y E. Knobil, 1985. Electrophysiological manifestation of luteinizing hormone releasing hormone pulse generator activity in the Rhesus Monkey: Influence of α -adrenérgic and Dopaminergic Blocking agents. *Endocrinology* 116: 1327-1333.

Kebabian, J.W. y D.B. Calne, 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature Lond* 227: 93-96.

Kim, K. , I.S. Lim, B.N. Cho, S.S. Kang, B.J. Lee, K. H. Choi, C.H. Chung, C.C. Lee, W. K. Cho y W. Wuttke, 1993. A partial blockade of catecholaminergic neurotransmission with 6-hidroxydopamine decreases mRNA level of gonadotropin releasing hormone in the male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 58: 146-152.

Kordon, C., S.V. Drouva, G. Martinez de la Escalera y R. Weiner. 1994. "Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin". En: Knobil E. y Neill J. (eds) *The physiology of reproduction* 2a ed. Raven Press Ltd., N.Y. pp. 1621- 1681.

Krieg , R.J. y C.H. Sawyer, 1976. Effects of intraventricular catecholamines on luteinizing hormone release in ovariectomized-steroid-pined rats. *Endocrinology* 99: 411-419.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Krsmanovic, L.Z., B.S. Stojilkovic, T.Balla, S. Al-Damluji, R. Weiner y K.J. Catt, 1991. Receptors and neurosecretory action of endothelin in hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 11124-11128.

Krsmanovic, L.Z., S.S. Stojilkovic, F. Merelli, S.M. Dufour, M.A. Virmani y D.J. Datt, 1992. Calcium signaling and episodic secretion of gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8462-8466.

Krsmanovic, L.Z., S.S. Stojilkovic, L.M. Mertz, M.Tomic y K.J. Catt, 1993. Expression of gonadotropin-releasing hormone receptors and autocrine regulation of neuropeptide release in immortalized hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 3908-3912.

Leppälüoto, J., P. Männistö, T. Ranta y M. Linnolla, 1976. Inhibition of mid-cycle gonadotrophin release in healthy women by pimozide and fusaric acid. *Acta Endocrinológica (Copen)* 81: 455-460.

Leranth, C., N.J. MacLusky, M. Shanabrough y F. Naftolin., 1988. Catecholaminergic innervation of luteinizing hormone-releasing hormone and glutamic acid decarboxylase immunopositive neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 48: 591-602.

Levine, J.E., K.F. Pau, V.D. Ramírez y G.L. Jackson, 1982. Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep. *Endocrinology* 111(5): 1449-1455.

Linder, M. E. y A. G. Gilman, 1992. G Proteins. *Sci. Am.* 276 (1): 36-43.

MacKenzie, F.J. A.J. Hunter, C. Daly y C.A. Wilson, 1984. Evidence that the dopaminergic Incerto-Hypotalamic Tract has a stimulatory effect on ovulation and gonadotrophin release. *Neuroendocrinology* 39: 289-295.

Mahan, L.C., R.M. Burch, F.J. Monsma Jr. y D.R. Sibley. 1990. "Expression of striatal D1 dopamine receptors coupled to inositol phosphate production and Ca²⁺ mobilization in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 2196-2200.

Martínez de la Escalera, G., A. L. Choi y R.I. Weiner, 1992 c Catecholaminergic regulation of the GT1 GnRH neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase. Montemagno, U, C. Nappi, F. Petraglia y A.R. Genazzani (eds). Proceedings of the second international Capri conference. The Parthenon Publishing Group, USA.

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

Martínez de la Escalera, G., F. Gallo, A. L. Choi y R. I. Weiner, 1992 b. 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: 2965-2971.

Martínez de la Escalera, G., L. Mendoza, A. Ochoa y D. Hol, 1993. Nuevas tendencias en el análisis experimental de la comunicación neuroendócrina: las células GT1. En: Comunicación Neuroendócrina bases celulares y moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. CONACyT pp.277-292.

Marx, J. L., 1987. Poliphosphoinositide research updated. Science 235: 974-976.

Mellon, P.L., J.J. Windle, P.C. Goldsmith, C.A. Padula, J.L. Roberts y R.I. Weiner, 1990. Immortalization of hypothalamic GnRH Neurons by Genetically Targeted Tumorigenesis. Neuron, 5: 1-10.

Monsma, F.J., Mahan, L.C., McVittie, L.D, Gerfen, C.R y Sibley, D.R., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6723-6727.

Muske, L. E., 1993. Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems. Brain Behav. Evol. 42: 215-230.

Negro-Vilar, A., J.P. Advis, S.R. Ojeda y S.M. McCann, 1982. Pulsatile luteinizing hormone (LH) patterns in ovariectomized rats: involvement of norpinephrine and dopamine in the release of LH-Releasing hormone and LH.

Endocrinology 111: 932-938.

Negro-Vilar, A., S.R. Ojeda y S.M. McCann. 1979. Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals *in vitro*. Endocrinology 104: 1749-1757.

Pasantés-Morales, H., 1993. Aminoácidos y aminas biogénicas en el sistema nervioso central: metabolismo y regulación. En: Comunicación Neuroendócrina bases celulares y moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. CONACyT. pp. 1-14.

Peroutka, S. J., 1994. Handbook of receptors and channels. G protein coupled receptors. CRC Press, USA.

Pierce, J.G., 1988. Gonadotropins: Chemistry and biosynthesis. En: Knobil, E. y Neill, J (eds.) "The Physiology of Reproduction" pp. 1335-1348. Raven Press, Ltd. New York USA.

Rasmussen, D. D., B. P. Kennedy, M. G. Ziegler y T. M. Nett, 1988. Endogenous opioid inhibition and facilitation of gonadotropin-releasing hormone release from the Median Eminence *in vitro*: potential role of catecholamines. Endocrinology 123: 2916-2921.

Rebec, G.V. y R.C. Pierce, 1994. A vitamin as a neuromodulator: Ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. Progress in Neurobiology 433: 537-565.

Robles-Flores, M., 1993. Transducción de señales hormonales acopladas al sistema de recambio de fosfolípidos con movilización de calcio. En: Comunicación Neuroendócrina, bases celulares y moleculares. SMCF CONACyT. pp. 123-134.

Rotsztein, W.H., J.L. Charli, E. Pattou y C.Kordon. 1977. Stimulation by dopamine of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) release from the mediobasal hypothalamus in male rats. Endocrinology 101: 1475-1483.

Sarkar, D. K. y G. Fink, 1981. Gonadotropin-releasing hormone surge: Possible modulation through postsynaptic α -adrenoreceptors and two pharmacologically distinct dopamine receptors. Endocrinology 108: 862-867.

Sawyer, C.H., 1975. Some recent developments in brain-pituitary-ovarian physiology. *Neuroendocrinology* 17: 97-124.

Seeburg, P.H. y Adelman, J. P., 1984. Characterization of cDNA for the precursor of LHRH. *Nature* 311: 666-668

Shivers, B.D., R.E. Harlan, J.I. Morrell, y D.W. Pfaff, 1983. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 304: 345-347.

Sibley, D. R., 1991. Cloning of a "D3" receptor subtype expands dopamine receptor family. *TIPS*, 12: 7-9.

Silverman, A. J., 1988. The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry. En: Knobil, E. y J. D. Neill (eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press Ltd, N.Y. pp.1283-1304.

Silverman, A.J., I. Levine, y F.W. Witkin. 1994. The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry and *in situ* hybridization. En: Knobil E. y J. D. Neill (eds) *The physiology of reproduction* 2^a ed. Raven Press Ltd., N.Y. pp. 1683-1709.

Smith, M.A. y Vale, W.W., 1981. Desensitization to gonadotropin-releasing hormone observed in superfused pituitary cells on cytodex beads. *Endocrinology* 108: 752-759.

Vallar, L. y J. Meldolesi, 1989. Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *TiPS*,10: 74-77.

Vijayan, E. y S.M. McCann, 1978. Re-evaluation of the role of catecholamines in control of gonadotropin and prolactin release. *Neuroendocrinology* 25: 150-165.

Vijayan, E. y S.M. McCann, 1978 (bis). The effect of systemic administration of dopamine and apomorphine on plasma LH and Prolactin concentrations in conscious rats. *Neuroendocrinology* 25: 221-235.

Watson, S. t Arkinstall, S., 1994. *The G-Protein linked receptor Facts Book*. Academic Press, London.

Weiner, R. Y., W. Wetsel, P. Goldsmith, G. Martínez de la Escalera, J. Windle, C. Padula, A. Choi, A. Negro-Vilar y P. Mellon. 1992. Gonadotropin-Releasing Hormone neuronal cell lines. En: Ganong, W. F., Martini, L. (eds) *Frontiers in neuroendocrinology*. Raven Press, New York, Vol (2) 13: 95-119.

Wetsel, W.C., M.M. Valença, I. Merchenthaler, Z. Liposits, F.J. López, R.I. Weiner, P.L. Mellon y A. Negro-Vilar, 1992. Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 4149-4153.