

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**Modulación por estradiol de la respuesta
adrenérgica en pineal de rata hembra:
caracterización de los mecanismos de acción
e identificación de los receptores
estrogénicos implicados**

Autor: Sánchez Sánchez, Juan José

**Directores: Rafael Alonso Solís
y Pedro Abreu González**

Departamento de Fisiología

A mis padres y hermanas/o,

A Elena,

**A toda aquella gente que sigue creyendo aún en la ciencia y lo
demuestra cada día.**

FINANCIACION

El presente trabajo ha sido realizado gracias a la financiación correspondiente a los siguientes proyectos de investigación:

- 1)** “Efectos antiestrogénicos de LY117018 en ratas hembras” (227-120/97). Investigador responsable: Dr. Guadalberto Hernández Hernández. Entidad financiadora: LILLY S.A. (Madrid).

- 2)** "Modulación por esteroides gonadales de la transmisión monoaminérgica" (PB97-1472-C03-01). Investigador responsable: Dr. Rafael Alonso Solís. Entidad financiadora: Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT).

- 3)** "Mecanismo de acción de los estrógenos: Caracterización de moduladores selectivos de los receptores estrogénicos" (FD97-1065-C03-01). Investigador responsable: Dr. Rafael Alonso Solís. Entidad es financiadoras: Comisión Europea y DGICYT.

- 4)** Así mismo, la realización de este trabajo ha sido posible gracias al disfrute de una beca concedida por la compañía LILLY España S.A. (Madrid).

- 5)** Por último, los compuestos LY170018-HCl e ICI182780 fueron cedidos, respectivamente, por las compañías LILLY S.A. (Madrid) y ASTRA-ZENECA (Madrid).

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible que este trabajo salga adelante y, especialmente:

Al Dr. Rafael Alonso por hacerme sentir en todo momento como parte esencial de este trabajo, dictando las directrices de forma coherente y depositando en mí una enorme confianza.

Al Dr. Pedro Abreu por trabajar conmigo codo a codo, con entrega y dedicación absoluta; aportándome constantemente el apoyo necesario además de su inestimable amistad.

Al Dr. Tomás González por su ayuda en la realización de las inmunofluorescencias, constante interés y esfuerzo en sacarme adelante.

Al Dr. Alexis Hernández por formarme como investigador en el campo de la Biología Molecular, proporcionándome un aliento continuo y sabios consejos de amigo.

Al Dr. Francisco Hernández por su inestimable ayuda incondicional tanto en la elaboración de este trabajo como por su preocupación por los que hemos continuado su labor científica.

Al Dr. Eduardo Salido por demostrarme con el ejemplo cómo se debe trabajar en ciencia, y darme la posibilidad de ampliar mis fronteras en el campo de la Genética.

Al Dr. Guadalberto Hernández quien ha gestionado mi beca durante dos años y los acuerdos con Lilly España S.A..

Al Dr. Luis Prieto por su asesoramiento en el procesamiento estadístico de los datos.

A José (I.N.T) y mis compañeros de laboratorio por apoyarme en todo momento, facilitándome todo lo necesario para el logro de nuestros objetivos científicos.

Al personal del animalario por ser rigurosos en su trabajo y posibilitar así empezar con buen pie cada experimento.

Al resto de profesores y personal del PAS del departamento de Fisiología por sus abundantes muestras de apoyo y preocupación por mi bienestar, ofreciéndome de buen grado cualquier cosa que he necesitado.

APÉNDICE A

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
B_{máx.}	Capacidad máxima de unión
Ca⁺²	Calcio
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CREB	Proteína que se fija al elemento de respuesta a AMPc
CREM	Elemento modulador de la respuesta a AMPc
CTx	Toxina Colérica
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DME	Medio de cultivo Dulbecco modificado
E₂	17-β-estradiol
E₂-BSA	17-β-estradiol unido a albúmina sérica bovina (BSA)
ERE	Elemento de respuesta a esteroides
FBS	Suero bovino fetal
FK	Forscolina
GCS	Ganglio cervical superior
GCSx	Ganglionectomía del GCS
Gs	Proteína fijadora de nucleótidos de guanina (proteína G)
HIOMT	Hidroindol-O-metil transferasa
HPLC-FD	Cromatografía líquida de alta eficacia con detección fluorimétrica
Hsp	Proteínas Hsp (" <i>Heat shock protein</i> ")
IBMX	3-Isobutil-metil-xantina
ICER	Represor temprano inducible por AMPc
IP₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
IPs	Inositoles fosfato totales (incluye IP ₃ , IP ₂ , IP ₁ ,IP)
ISO	Isoproterenol
K_d	Constante de disociación
NE	Norepinefrina
NAS	5-Hidroxi-N-acetil serotonina
NAT	Arilamina-N-acetil transferasa
NPV	Núcleo paraventricular del hipotálamo
NSQ	Núcleo supraquiasmático del hipotálamo
OVX	Ovariectomía bilateral
Pg	Progesterona
PHE	Fenilefrina
PIP₂	Fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Poli-D-lisina

PLL	Poli-L-Lisina
RA	Receptor de andrógenos
RAR	Receptor de ácido retinoico
RE	Receptor de estradiol
REa	Receptor de estrógenos α
REb	Receptor de estrógenos β
RG	Receptor de glucocorticoides
RHE	Receptor de hormonas esteroideas
RM	Receptor de mineralocorticoides
RPg	Receptor de progesterona
RT	Receptor de hormonas tiroideas
RT-PCR	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
RU486	Antiprogestágeno
RV	Receptor de vitamina D
SERM	Modulador selectivo del receptor de estrógenos
SNAT	Serotonina N-acetil-transferasa
SNC	Sistema nervioso central
TH	Tirosina hidroxilasa
TPH	Triptófano hidroxilasa
TRP	Triptófano
Tx	Tamoxifeno
5-HT	Serotonina
5-HIAA	5-Hidroxi-indol-acético
l	Longitud de onda

ANGLICISMOS

Norther-Blot	Análisis de ARN basado en sondas específicas
Primer	Cebador de la reacción de polimerización
RT-PCR	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
Western-Blot	Inmunodetección de proteínas en membranas

INTRODUCCIÓN

ANATOMÍA E INERVACIÓN DE LA PINEAL DE LA RATA	1
1. Anatomía	1
2. Inervación	3
2.1. <i>Inervación simpática periférica</i>	3
2.2. <i>Inervación simpática central o pinealopetal</i>	4
LA GLÁNDULA PINEAL COMO ÓRGANO ENDOCRINO	4
1. Variaciones circadianas en el metabolismo pineal	6
2. Estimulación adrenérgica de la glándula pineal	7
3. La señal de AMPc: Importancia en la regulación de la expresión génica en la pineal	8
4. Mecanismos no genómicos de control de la sNAT	10
REGULACIÓN HORMONAL DE LA FUNCIÓN PINEAL	11
1. Mecanismos de acción de las hormonas esteroideas	12
1.1. <i>El receptor intracelular de hormonas esteroideas</i>	12
1.1.1. <i>Estructura del receptor estrogénico</i>	13
1.1.2. <i>Localización del receptor estrogénico</i>	15
1.1.3. <i>Mecanismos de acción del receptor estrogénico</i>	16
1.2. <i>Acciones no genómicas de las hormonas esteroideas</i>	17
2. Efectos de las hormonas ováricas sobre el metabolismo pineal	18
2.1. <i>Cambios en la bioquímica pineal durante el ciclo del estro</i> ..	18
2.2. <i>Efecto de la ovariectomía y la administración de hormonas ováricas</i>	19
OBJETIVOS	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
OBJETIVOS DEL ESTUDIO	21
MATERIAL Y MÉTODOS	23

ANIMALES	23
CULTIVO CELULAR	23
1. Dispersión de las células pineales	23
2. Tratamiento con hormonas ováricas y agonistas adrenérgicos	24
3. Preparación de las placas para el cultivo celular	25
METODOS BIOQUIMICOS	27
1. Medida de los niveles intracelulares de AMPc	27
1.1. <i>Selección de protocolos para la medición de AMPc en glándulas enteras</i>	28
2. Medida de la actividad Fosfolipasa C	29
3. Medida de la actividad sNAT	31
4. Medida de los niveles de indoles	33
5. Medida de la capacidad de ligado del b₁-adrenoceptor	34
6. Análisis de ARN mediante “RT-PCR”	35
6.1. <i>Extracción del ARN total</i>	35
6.2. <i>Síntesis de ADNc</i>	35
6.3. <i>Reacciones de PCR</i>	36
6.4. <i>Diseño de los “primers”</i>	36
6.5. <i>Visualización de la señal</i>	38
6.6. <i>Precuaciones metodológicas</i>	38
7. Análisis de proteínas mediante “Western blot”	39
7.1. <i>Recolección de las células</i>	39
7.2. <i>Electroforesis</i>	39
7.3. <i>Transferencia</i>	40
7.4. <i>Incubación con los anticuerpos</i>	40
7.5. <i>Revelado</i>	41
MÉTODOS MORFOLÓGICOS	42
1. Inmunofluorescencia	42
METODOS ESTADISTICOS	43
RESULTADOS	44
CARACTERIZACIÓN DE LA ACCIÓN DEL ESTRADIOL	44

1. Relación entre la concentración de E ₂ y la respuesta del pinealocito a la estimulación adrenérgica	44
1.1. Efecto del estradiol sobre la estimulación b-adrenérgica ..	44
1.2. Efecto del estradiol sobre la estimulación a-adrenérgica ..	46
2. Curso temporal del efecto del E ₂ : Tiempo mínimo necesario de exposición a la hormona para observar el efecto	48
3. Identificación del lugar de acción del E ₂ : ¿A nivel de membrana o intracelular?	49
3.1. Efecto del E ₂ sobre la acumulación de AMPc intracelular ..	50
3.2. Efecto del E ₂ sobre la actividad sNAT	50
4. Esteroespecificidad del efecto del E ₂	51
4.1. Efecto del 17a-E ₂ sobre la estimulación b-adrenérgica	52
4.2. Efecto del 17a-E ₂ sobre la estimulación a-adrenérgica	52
5. Experimentos in vivo	54
5.1. Dosis-respuesta del E ₂ sobre la estimulación b-adrenérgica	54
5.2. Efecto del E ₂ sobre la sNAT	55
5.3. Efecto del E ₂ y de moduladores del RE (SERMs) sobre los principales indoles de la ruta biosintética de la melatonina.....	57
6. Resumen	61
 IDENTIFICACIÓN DE LA DIANA MEDIADORA DEL EFECTO DEL ESTRADIOL	62
1. Implicación de las proteínas Gs en la regulación adrenérgica del E ₂	62
2. Un tratamiento con FK de células pineales, previo a la exposición a E ₂ , anula el efecto inhibitorio de la hormona sobre la respuesta b-adrenérgica	64
3. Expresión del receptor b1-adrenérgico	65
4. Capacidad de ligado del receptor b1-adrenérgico.....	66
5. Resumen	69
 IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES INTRACELULARES PARA EL ESTRADIOL EN EL PINEALOCITO	69
1. Identificación de subtipos de REs en pinealocitos mediante RT-PCR	70

2. Detección de subtipos proteicos de REs en pinealocitos y efecto del estradiol sobre su receptor mediante “Western blot”	71
3. Identificación y localización de subtipos de REs en pinealocitos mediante Inmunofluorescencia	74
4. Dinámica del receptor	75
4.1. <i>Traslocación del RE</i>	75
4.2. <i>Efecto del SERM ICI182780 sobre la traslocación del RE</i> ..	78
5. Resumen	80
DISCUSIÓN	81
CARACTERIZACIÓN DE LA ACCIÓN DEL ESTRADIOL	82
1. Efecto del estradiol sobre la respuesta adrenérgica	82
2. Curso temporal, lugar de acción y esteroespecificidad del efecto del E ₂	85
IDENTIFICACIÓN DE LA DIANA MEDIADORA DEL EFECTO DEL ESTRADIOL	87
IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES INTRACELULARES PARA EL ESTRADIOL EN EL PINEALOCITO	91
CONCLUSIONES	96
BIBLIOGRAFÍA	98
APÉNDICE B: Publicaciones y comunicaciones a congresos	112

Introducción

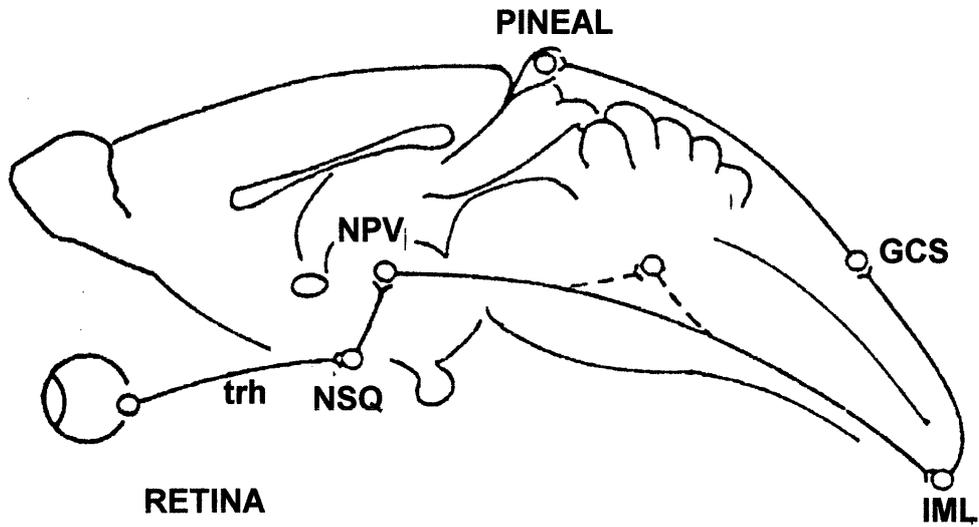
La glándula pineal es un órgano situado en el cerebro, con una ubicación y características funcionales que varían en relación con la especie y su grado evolutivo. La pineal humana tiene una localización de tipo profundo, estando adosada al techo del tercer ventrículo, mientras que la de la rata es de tipo superficial y está situada debajo del cráneo (Fig. 1) (Pevet, 1983). Su función muestra una evolución filogenética, comportándose como una estructura fotosensible en peces, anfibios y aves, y como un órgano neuroendocrino en mamíferos. En este último caso una señal nerviosa procedente de la retina, a través de una vía aferente noradrenérgica, regula la producción y liberación de la melatonina, la hormona pineal producto del metabolismo del triptófano. La biosíntesis de melatonina presenta un ritmo de naturaleza circadiana, siendo máxima durante la fase de oscuridad y mínima en presencia de luz (Reiter, 1991). De esta forma la hormona es responsable de la adaptación circadiana y estacional de toda una serie de procesos fisiológicos, entre los que destaca la actividad reproductora (Alonso, 2001). Existen, además, toda una serie de evidencias experimentales que conducen a considerar la glándula pineal como un punto de integración de señales nerviosas y endocrinas y, por tanto, un excelente modelo donde estudiar los mecanismos celulares involucrados en tales procesos, objetivo fundamental del presente estudio.

ANATOMÍA E INERVACIÓN DE LA PINEAL DE LA RATA

1. Anatomía

La glándula pineal de rata presenta una localización superficial, consecuencia de la migración en sentido dorsocaudal de las células pineales durante el desarrollo embrionario. Se encuentra situada debajo del cráneo a nivel del punto lambda, siendo éste el punto medio de la curvatura descrita por la sutura de los huesos parietales con el interparietal. En el encéfalo la pineal ocupa un espacio delimitado rostralmente por el ángulo que forman la corteza cerebral retrosplenial y estriada de cada hemisferio, y dorsalmente por los lóbulos 4 y 5 del cerebelo. La glándula se encuentra recubierta

A



B

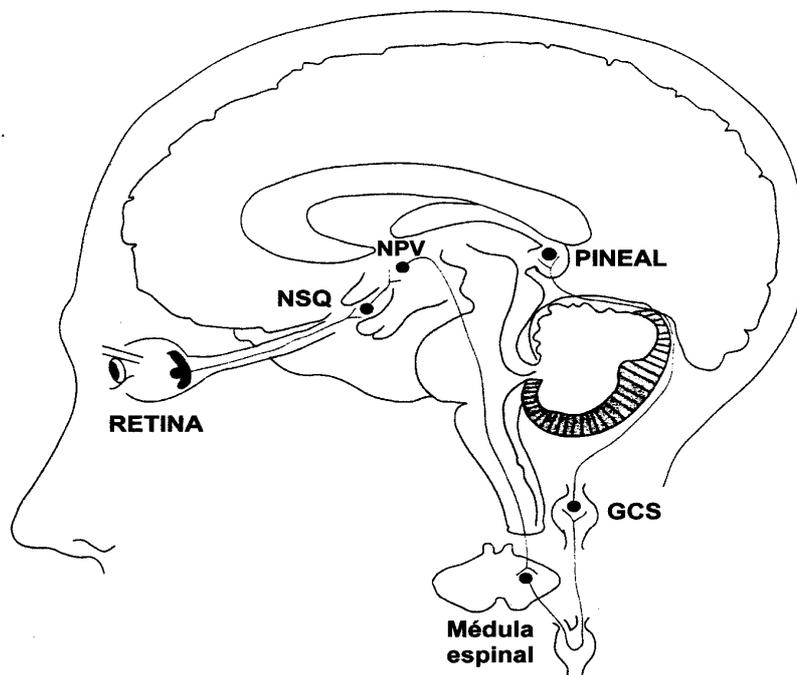


Figura 1. Las conexiones neurales entre la retina y la pineal son similares en todos los mamíferos, incluido el hombre. A. Inervación simpática periférica de la glándula pineal de rata (Modificada de Bittman, 1984). B. Inervación simpática periférica de la glándula pineal humana (Tomada de Alonso, 2001). NSQ: núcleo supraquiasmático; NPV: núcleo paraventricular; IML: columna intermedio lateral; GCS: glánglio cervical superior; *trh*: tracto retinohipotalámico.

por la piamadre y conectada al diencéfalo mediante un pedúnculo constituido por vasos sanguíneos, fibras nerviosas y tejido conectivo.

2. Inervación

Las fibras nerviosas simpáticas procedentes del ganglio cervical superior son, sin duda, la inervación principal de la glándula. Forman parte de una vía multisináptica con origen en la retina y que conduce hasta la pineal la información lumínica procesada bajo la forma de impulsos nerviosos, siendo, por tanto, responsable del ritmo circadiano en la biosíntesis y liberación de melatonina. Sin embargo, una serie de evidencias experimentales apuntan hacia la existencia de una posible fuente de inervación procedente de diversas áreas cerebrales y que ha venido a denominarse inervación central o pinealopetal (Korf y Moller, 1984).

2.1. Inervación simpática periférica

Tal y como ilustra la figura 1 los impulsos nerviosos generados en las células fotorreceptoras de la retina son enviados hacia el hipotálamo anterior mediante un haz de fibras que constituyen el tracto retinohipotalámico (Moore, 1982). A nivel del quiasma óptico, estas fibras se separan del tracto óptico principal para dirigirse al núcleo supraquiasmático del hipotálamo anterior (NSQ), desde donde se inicia una vía multisináptica que hace escala en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) y en la columna intermediolateral de la médula espinal torácica. Desde este núcleo espinal parten los axones preganglionares que proyectan hacia el ganglio cervical superior (GCS), cuyas fibras postganglionares alcanzan la glándula pineal mediante el nervio carotideo interno y el nervio coronario (Reiter, 1986). Los terminales simpáticos liberan el neurotransmisor norepinefrina (NE) hacia el espacio intercelular sin llegar a establecer verdaderos contactos sinápticos con los pinealocitos (Korf y Moller, 1984).

2.2. Inervación central o pinealopetal

La primera evidencia de la existencia de una inervación pineal procedente del sistema nervioso central (SNC) fue aportada por Schapiro y Salas en 1971 al demostrar que la glándula era capaz de recibir estímulos luminosos en ratas ganglionectomizadas bilateralmente (Schapiro y Salas, 1971). Además de la inervación simpática de origen periférico, se han aportado indicios de la existencia de fibras simpáticas procedentes del núcleo de la habénula. Las conexiones de estas fibras con centros tales como la amígdala, hipotálamo lateral, septum y bulbo olfatorio (Dafny, 1977) indican que, además de información lumínica (Schapiro y Salas, 1971; Dafny, 1980), transmiten información de tipo sensorial.

A través de estudios llevados a cabo inyectando peroxidasa de rábano como marcador en la pineal se ha descrito la presencia de fibras procedentes del NPV (Guerillot et al., 1982). También se ha sugerido la posibilidad de que la glándula pineal pudiese estar inervada por una vía nerviosa catecolaminérgica, de origen central, y que, probablemente, utilice la dopamina (DA) como neurotransmisor. En esta dirección, se ha demostrado que, en células pineales de rata en cultivo, la DA es capaz de incrementar los niveles intracelulares de calcio, activar la hidrólisis de fosfatidilinositol y aumentar los niveles intracelulares de AMPc (Rey et al., 1997). Estos efectos podrían estar mediados por receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 identificados en la pineal (Govitrapong et al., 1989).

LA GLÁNDULA PINEAL COMO ÓRGANO ENDOCRINO

El principal producto de secreción sintetizado por la glándula pineal es la melatonina (N-acetil-5 metoxitriptamina, Fig. 2), hormona de naturaleza metoindólica derivada del triptófano. Tal y como ilustra la figura 2, el primer paso en la biosíntesis de melatonina es la captación de su precursor, el triptófano, desde el torrente circulatorio. El triptófano sufre entonces una hidroxilación en la posición 5 del anillo indólico, catalizada por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH, E.C.1.14.3.b). El 5-hidroxitriptófano formado es rápidamente transformado a 5-

hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) mediante una descarboxilación llevada a cabo por la enzima L-aminoácido-aromático descarboxilasa (E.C.4.1.1.28).

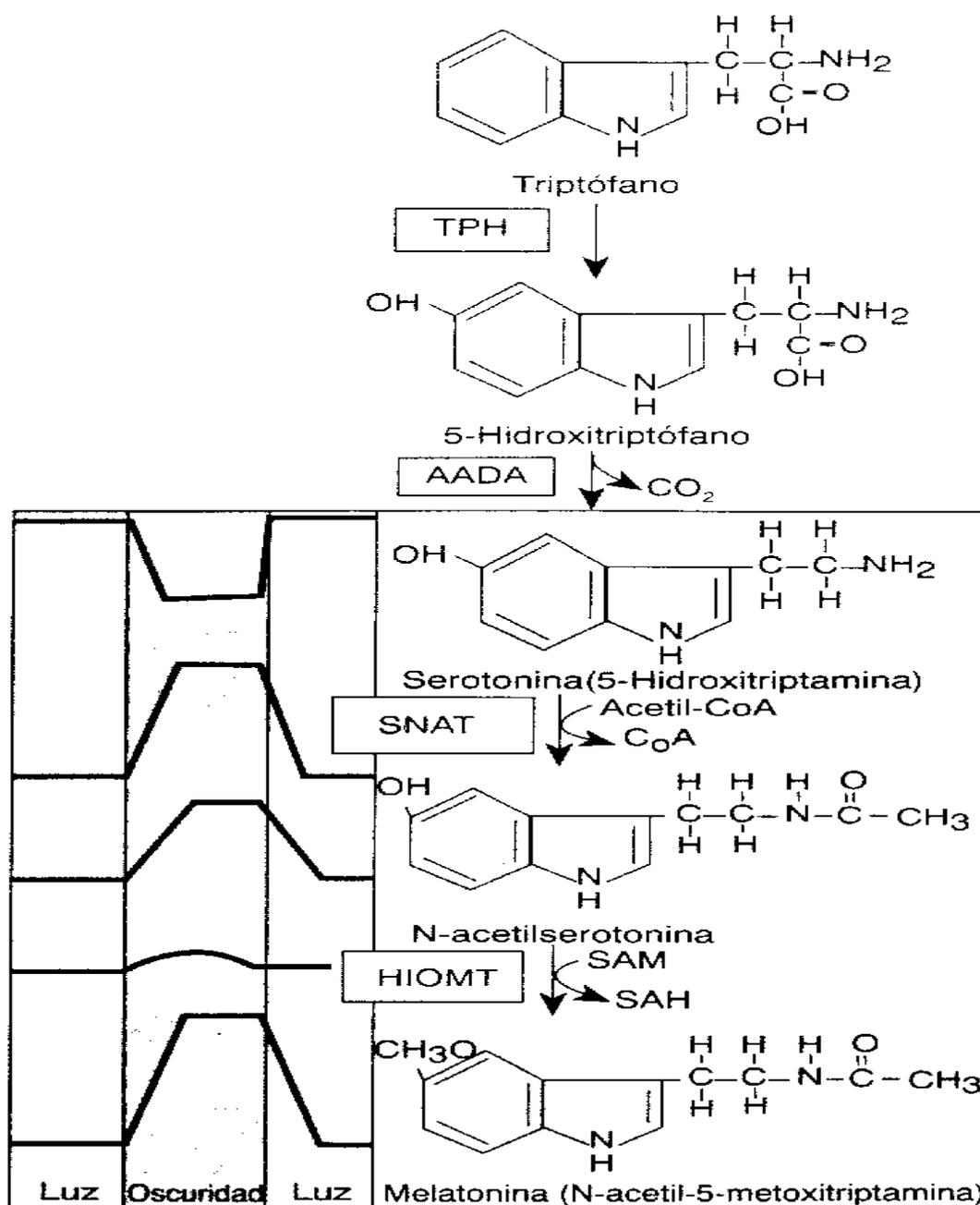


Figura 2. Metabolismo indólico en la glándula pineal. El cuadro de la izquierda representa los principales pasos enzimáticos en la síntesis de melatonina, mostrando esquemáticamente las variaciones diarias en la concentración de cada compuesto y en la actividad de los enzimas implicados. AADA: aminoácido aromático descarboxilasa; CoA: coenzima A; HIOMT: hidroxindol-O-metil-transferasa; MAO: monoaminoxidasa; sNAT: N-acetiltransferasa; SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteia; TPH: triptófano hidroxilasa. (Tomada de Alonso, 2001).

La 5-HT sufre una reacción de N-acetilación en su extremo amino catalizada por la enzima serotonina-N-acetil transferasa (sNAT; E.C.2.3.1.87), originando la 5-hidroxi-N-acetil serotonina (NAS), siendo éste el paso limitante en la biosíntesis de melatonina. La sNAT presenta diferencias cinéticas y estructurales con la arilamina-N-acetil transferasa (aNAT) existente en tejidos tales como el hígado, sangre o la propia pineal (Voisin et al., 1984). En la glándula pineal también existe aNAT, pero ésta no acetila indolaminas, su actividad no es inducible por la NE y puede ser separada de la sNAT por HPLC. Finalmente la NAS es transformada en melatonina mediante una reacción de metilación del grupo hidroxilo situado en la posición 5 del anillo indólico, paso catalizado por la enzima hidroxindol-O-metil-transferasa (HIOMT, E.C.2.1.1.4) (Axelrod y Weissbach, 1960).

1. Variaciones circadianas en el metabolismo pineal

Teniendo en cuenta que la biosíntesis de melatonina pineal está regulada por el fotoperiodo, no es de extrañar que, tanto las actividades enzimáticas como los productos de las reacciones que catalizan, sufran variaciones circadianas. En todas las especies estudiadas, tanto de actividad diurna como nocturna, la producción y secreción de melatonina es mínima durante el día, incrementándose de forma brusca durante las horas de oscuridad. La sincronización entre la biosíntesis de la hormona y el ciclo luz-oscuridad ambiental se realiza fundamentalmente a través de la inervación periférica simpática. El peso específico de dicha vía neural sobre el control circadiano del metabolismo pineal ha sido puesto de manifiesto por diversos autores (Korf y Moller, 1984; Moore, 1996). De esta forma, se ha descrito un incremento nocturno en la concentración de NA liberada desde los terminales simpáticos durante la fase oscura del ciclo (Wurtman y Axelrod, 1974). El incremento en los niveles nocturnos de NE en la pineal conduce a un aumento en la expresión y actividad de la sNAT (Klein et al., 1992; Borigin et al., 1995), y a una elevación en la síntesis y liberación de melatonina hacia la mitad de la fase oscura. Consecuencia de ello es que la 5-HT, sustrato de la sNAT, presenta un marcado ritmo circadiano, con valores máximos durante la fase de luz, que descienden bruscamente durante la noche (King et al., 1984). Gauer en 1996 describió una

variación rítmica en los niveles del RNAm de la HIOMT (Gauer y Craft, 1996), que el autor atribuye a un reloj interno de la pineal, ya que dicho ritmo persiste en animales mantenidos en oscuridad continua.

El ciclo luz-oscuridad también afecta a la expresión de los receptores de NE presentes en el pinealocito (Pangerl et al., 1990). En este sentido se ha descrito un ritmo circadiano en niveles de RNAm de los receptores β_1 (Carter, 1993; Moller et al., 1997) y α_1 -adrenérgicos (Coon et al., 1997), con valores máximos hacia la mitad de la fase oscura, coincidiendo con los valores mas elevados de unión para el receptor β_1 (González-Brito et al., 1988). Durante el día las señales nerviosas procedentes de la retina alcanzan el NSQ a través del tracto retinohipotalámico y deprimen su actividad, disminuyendo de esta forma la producción y liberación de melatonina hasta los niveles basales.

2. Estimulación adrenérgica de la glándula pineal

La NE liberada desde los terminales simpáticos interacciona con los receptores de tipo α y β adrenérgicos situados en la membrana del pinealocito (Fig. 3) (Pangerl et al., 1990). La estimulación del receptor β se traduce en una activación de la adenilato ciclasa (AC), a quien se encuentra acoplado mediante una proteína Gs. Ello conduce a un rápido incremento, de unas 60 a 100 veces, en los niveles intracelulares de AMPc producido por la AC a partir de ATP (Klein et al., 1978; Ho y Chik, 1990; Roger y Lynne, 1993).

Sin embargo la máxima respuesta se produce cuando la NE interacciona simultáneamente con los receptores α -adrenérgicos. Aunque la estimulación aislada del receptor α no tiene efecto alguno sobre los niveles basales de AMPc, potencia de forma sinérgica la producción de este segundo mensajero inducida por el receptor β (sinergismo α - β) (Vanecek et al., 1985). Estudios farmacológicos realizados en este sentido indican que el receptor implicado pertenece al subtipo α_1 (Klein et al., 1983; Vanecek et al., 1985), que se encuentra acoplado mediante una proteína G a la enzima fosfatidilinositol fosfodiesterasa (fosfolipasa C, PLC) (Roger y Lynne, 1993). De esta forma, la activación de dicho receptor induce la hidrólisis del fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato (PIP₂) a inositol trifosfato (IP₃) y

diacilglicerol (DAG) (Ho y Klein, 1987 y Ho et al., 1988a). Mediante el IP₃ formado, la NE incrementa la concentración intracelular de calcio ([Ca⁺²]i) a través de la movilización de los reservorios citoplasmáticos de este ión (Schomerus et al., 1995; Marín et al., 1995). Los mecanismos que subyacen en tal potenciación aún no han sido aclarados. Aunque en membranas obtenidas a partir de plaquetas humanas se ha descrito una supresión del efecto inhibitorio de las proteínas Gi sobre la AC tras su fosforilación por la PKC (Katada et al., 1985), este fenómeno ha sido descartado en pinealocitos (Sugden, 1990), sugiriéndose una fosforilación directa sobre la proteínas Gs o la propia AC.

3. La señal de AMPc: Importancia en la regulación de la expresión génica en la pineal

La elevación en los niveles intracelulares de AMPc se traduce en la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (proteína quinasa A, PKA). La PKA, a través de reacciones de fosforilación, incrementa la actividad enzimática de la sNAT (enzima limitante en la biosíntesis de la melatonina), induciendo la transcripción del gen que la codifica, la posterior traducción del RNAm formado, y estabilizando directamente la propia proteína una vez formada (Fig. 3). Además de niveles elevados de AMPc, la activación de la sNAT necesita de la hiperpolarización del pinealocito producida por la NE (Ceña et al., 1991). El incremento en la actividad sNAT mediado por el AMPc requiere como primer paso el aumento en su expresión génica. Prueba de ello es que alcanzar la máxima actividad enzimática requiere de 5-6 horas de estimulación con NE o agonistas β-adrenérgicos (Klein et al., 1983), siendo este efecto bloqueado por inhibidores de la transcripción como la actinomicina D (Roseboom et al., 1996).

Las subunidades catalíticas de la PKA, activada por el AMPc, se translocan al núcleo celular, donde fosforilan los residuos de serina de un factor de transcripción denominado CREB ("*cAMP responsive element binding protein*") (Stehle, 1995). La forma fosforilada del CREB (p-CREB) regula la transcripción de los genes CRE ("*cAMP responsive element*") y

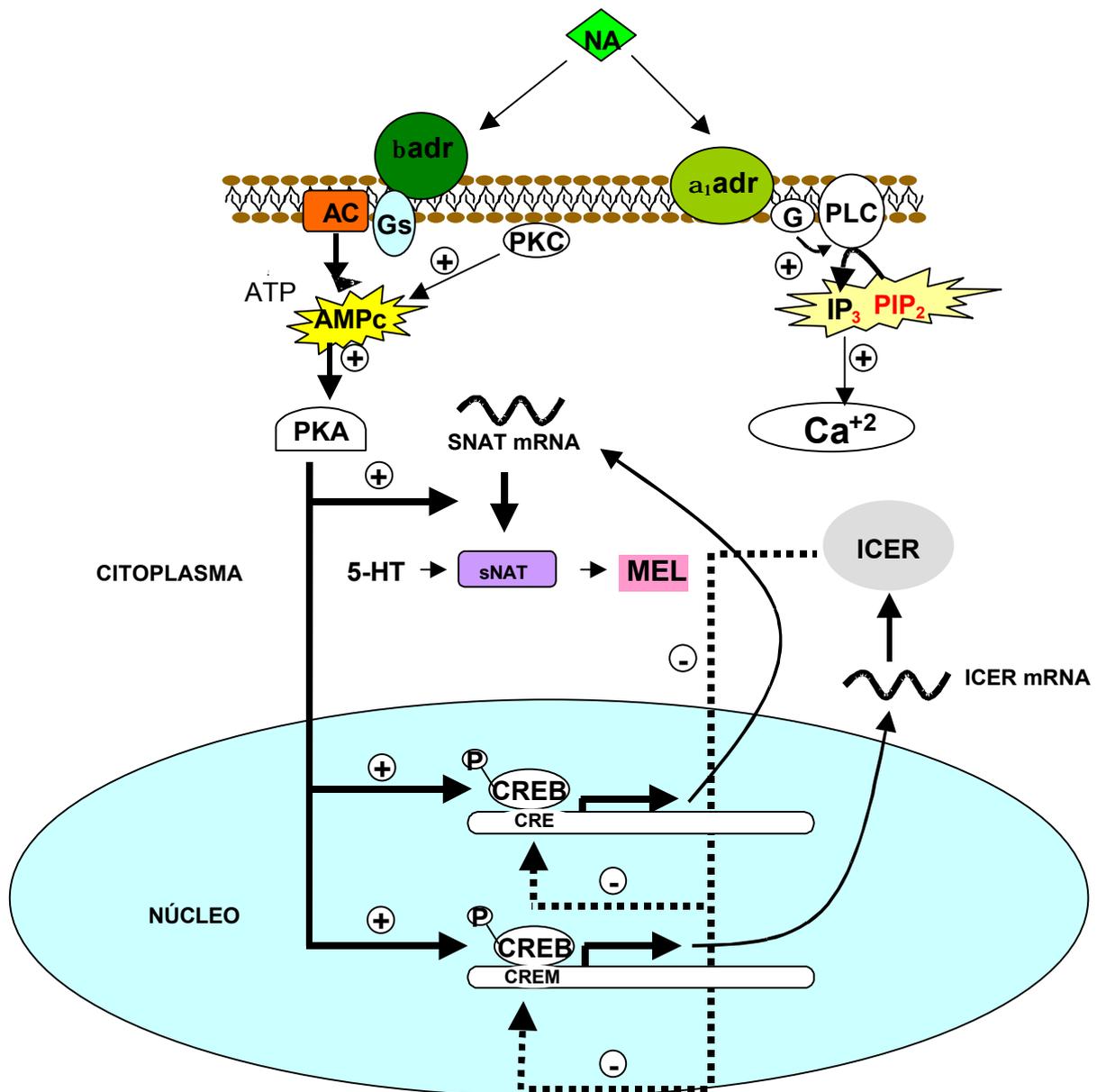


Figura 3. Regulación noradrenérgica de la biosíntesis de melatonina en la glándula pineal. El esquema muestra los mecanismos de segundos mensajeros activados por la interacción de la noradrenalina con los receptores α_1 y β -adrenérgicos, así como la regulación de la expresión génica de la sNAT. NA: noradrenalina; β -adr: receptor β -adrenérgico; AC: adenilato ciclasa; Gs: proteína fijadora de nucleótidos de guanina (proteína Gs); α_1 -adr: receptor α_1 -adrenérgico; PKC: proteína quinasa C; PLC: fosfatidilinositol fosfodiesterasa (fosfolipasa C); PIP_2 : fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato; IP_3 : inositol trifosfato; PKA: proteína quinasa A; CREB: proteína que se fija al elemento de respuesta a AMPc; CRE: elemento de respuesta a AMPc; CREM: elemento modulador de la respuesta a AMPc; ICER: represor temprano inducible por AMPc; 5-HT: serotonina; MEL: melatonina, sNAT: serotonina N-acetil transferasa. (Modificada de Hernández Díaz, 1999).

CREM ("cAMP-responsive element modulator") (Stehle, 1995). La interacción del p-CREB con el CRE conduce a un aumento en la transcripción del gen de la sNAT y

en definitiva de la actividad metabólica pineal (Baler et al., 1997). La posterior transducción del RNAm formado y la estabilización de la enzima, ambos procesos favorecidos directamente por la PKA, se traduce en el incremento nocturno en la actividad sNAT y, consecuentemente, en la biosíntesis de melatonina. Simultáneamente, la interacción del p-CREB con el gen CREM induce la expresión y síntesis del factor de transcripción ICER ("*inducible cAMP early repressor*"), que es un potente represor de los genes inducibles por AMPc, uniéndose con una afinidad muy elevada a la secuencia CRE (Stehle et al., 1993; Stehle, 1995). El ICER ejerce efectos de carácter inhibitorio, reprimiendo tanto la expresión de la sNAT como su propia transcripción (Stehle et al., 1993; Stehle, 1995). Es de destacar el papel que juega el ICER en el declive que experimentan tanto la cantidad como la actividad sNAT hacia el final de la fase oscura, debido a que su transcripción está regulada por la inervación noradrenérgica procedente del ganglio cervical superior (Stehle et al., 1993). Además, la expresión del ICER presenta un claro ritmo circadiano muy similar al de la sNAT, con un máximo entre las 4-6 horas previas al inicio de la fase luminosa del ciclo luz -oscuridad (Stehle et al., 1993).

Aunque es evidente el papel del promotor CRE referente a la regulación de la expresión de la sNAT, recientemente se ha descubierto un nuevo promotor denominado CCAAT, que es activado por miembros una familia de proteínas denominada CATBP. El CCAAT actuaría de forma combinada con el CRE en la inducción transcripcional de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de la melatonina (Baler et al., 1997).

4. Mecanismos no genómicos de control de la sNAT

La elevación nocturna en la actividad y cantidad de la sNAT puede ser impedida de forma inmediata tras el bloqueo de la señal neural procedente del GCS mediante una exposición corta a la luz o tras 15 minutos de la administración de propranolol, un antagonista β -adrenérgico, en la fase oscura del ciclo (Gastel et al., 1998). *In vitro*, el efecto del propranolol es bloqueado por la presencia del dibutiril-AMPc o inhibidores de la proteólisis (Gastel et al., 1998). Estos datos evidencian una regulación rápida ejercida por el AMPc sobre la sNAT, impidiendo las reacciones de

proteolisis y favoreciendo, de este modo, la estabilidad de la enzima. Al finalizar la fase nocturna del ciclo, el efecto represor del ICER junto con la proteolisis de la enzima, activada tras la caída de los niveles de AMPc (debido al descenso en la descarga de NE), serían los elementos responsables en la disminución de la sNAT hasta sus valores basales diurnos.

Por último, en experimentos realizados *in vitro* se ha podido constatar la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por la PKC sobre la ruta de segundos mensajeros asociada al receptor α_1 -adrenérgico (Sugden et al., 1988). En este sentido, una exposición previa de las células pineales a ésteres del forbol, ejerce un efecto inhibitorio sobre la hidrólisis de PIP₂ y la entrada de Ca⁺² producidos tras la estimulación con NE o fenilefrina (PHE, agonista α_1 -adrenérgico).

REGULACIÓN HORMONAL DE LA FUNCIÓN PINEAL

Tal y como se ha descrito hasta el momento, la síntesis de la melatonina se encuentra controlada principalmente por la inervación periférica noradrenérgica. Sin embargo se sabe que la melatonina participa en la modulación del resto del sistema endocrino, siendo la responsable de sus adaptaciones circadianas y estacionales en relación con el fotoperíodo (Reiter, 1991). No es de extrañar, por tanto, que los niveles de hormonas circulantes modifiquen, a su vez, la síntesis de la hormona pineal (Reiter, 1986). Ello confiere a la glándula pineal un doble carácter: 1) Transductor neuroendocrino, transformando una señal nerviosa constituida por la liberación de NA en otra endocrina mediante la síntesis de melatonina, y 2) Transductor endocrino-endocrino, detectando cambios en la secreción de diversas hormonas que modifican la producción de melatonina.

Especial atención merecen los esteroides gonadales debido a la fuerte influencia de la melatonina sobre la fisiología de la reproducción, actuando sobre el eje hipotálamo-adenohipófisario-gonadal de un modo generalmente inhibitorio (Reiter, 1991). De la misma manera, las hormonas sexuales regulan los niveles circulantes de melatonina, actuando directamente sobre la pineal o modificando diversos aspectos funcionales de la vía neural que la inerva. Los cambios en los niveles séricos de melatonina durante el ciclo del estro en la rata hembra constituyen

un buen ejemplo de tales efectos. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio, así como los aportados por otros autores, señalan al estradiol (E_2), como un potente agente regulador del metabolismo pineal (Alonso et al., 1993; Hernández Díaz, 1999).

1. Mecanismos de acción de las hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas ejercen sus efectos interaccionando con dos tipos de receptores situados en sus células diana. En primer lugar pueden actuar a través de sus clásicos y bien estudiados receptores nucleares. La unión de la hormona con el receptor induce en éste un cambio conformacional que permite su unión a secuencias específicas del ADN y la regulación de la expresión de diversos genes. Ello se traduce en toda una serie de efectos de índole morfológico y funcional, por regla general de aparición tardía y con carácter duradero (horas, días o incluso años). Sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto la existencia de un segundo tipo de receptores esteroideos de membrana, que aún no han sido correctamente identificados (Nadal et al., 2001). Estos receptores, modificando directamente la actividad de ciertos canales iónicos o activando rutas de segundos mensajeros a través de proteínas G, serían los responsables de toda una serie de acciones rápidas (segundos, minutos, horas) ejercidas por este tipo de hormonas (McEwen, 1991; Wehling, 1994; Alonso y López-Coviella, 1998; Valverde et al., 1999).

1.1. El receptor intracelular de hormonas esteroideas

Los receptores esteroideos se encuentran englobados dentro de lo que se conoce como la "superfamilia de receptores hormonales nucleares". En ella se engloban los receptores a estrógenos (RE), progesterona (RPg), glucocorticoides (RG), mineralocorticoides (RM), andrógenos (RA), hormonas tiroideas (RT), vitamina D (RVD) y ácido retinoico (RAR). Desde un punto de vista funcional los miembros de esta superfamilia se subdividen en dos grupos (Tsai y O'Malley, 1994). El primero de ellos, constituido por los receptores a hormonas esteroideas (RE, RPg, RG, RM y RA) suelen ejercer sus efectos como homodímeros, aunque este hecho se halla en

revisión en base al reciente descubrimiento de un nuevo subtipo del RE (Kuiper et al., 1996), y su actividad se encuentra regulada por proteínas del tipo Hsp ("*heat-shock proteins*"). Por el contrario los receptores incluidos en el segundo grupo (RT, RVD y RAR) no se encuentran asociados a Hsp, y son capaces de unirse a secuencias de ADN bajo la forma de heterodímeros (Tsai y O'Malley, 1994). Teniendo en cuenta los objetivos finales del presente trabajo, en adelante nos limitaremos a la descripción del RE.

1.1.1. *Estructura del receptor estrogénico*

Como se muestra en la figura 4. A, el RE se encuentra subdividido en varios dominios funcionales. El dominio A/B, situado en la región N-terminal, es donde reside una de las dos funciones de transactivación (denominada AF-1) que posee el receptor, mediante las cuales regula la expresión de los genes diana a través de interacciones con la maquinaria transcripcional de la célula. El dominio C está implicado en la dimerización del receptor, paso previo y necesario para su unión al elemento de respuesta al estrógeno (ERE). La región D, parece participar en la localización nuclear del receptor. El dominio E, o dominio de unión a la hormona, es una zona muy importante del receptor puesto que en ella reside, además, la segunda función de transactivación (AF-2). Finalmente, situado en el extremo C-terminal del RE se encuentra el dominio F, cuya función es aún desconocida. Las dos funciones de transactivación, AF-1 y AF-2, además de estar localizadas en dominios diferentes, parecen actuar de una manera autónoma.

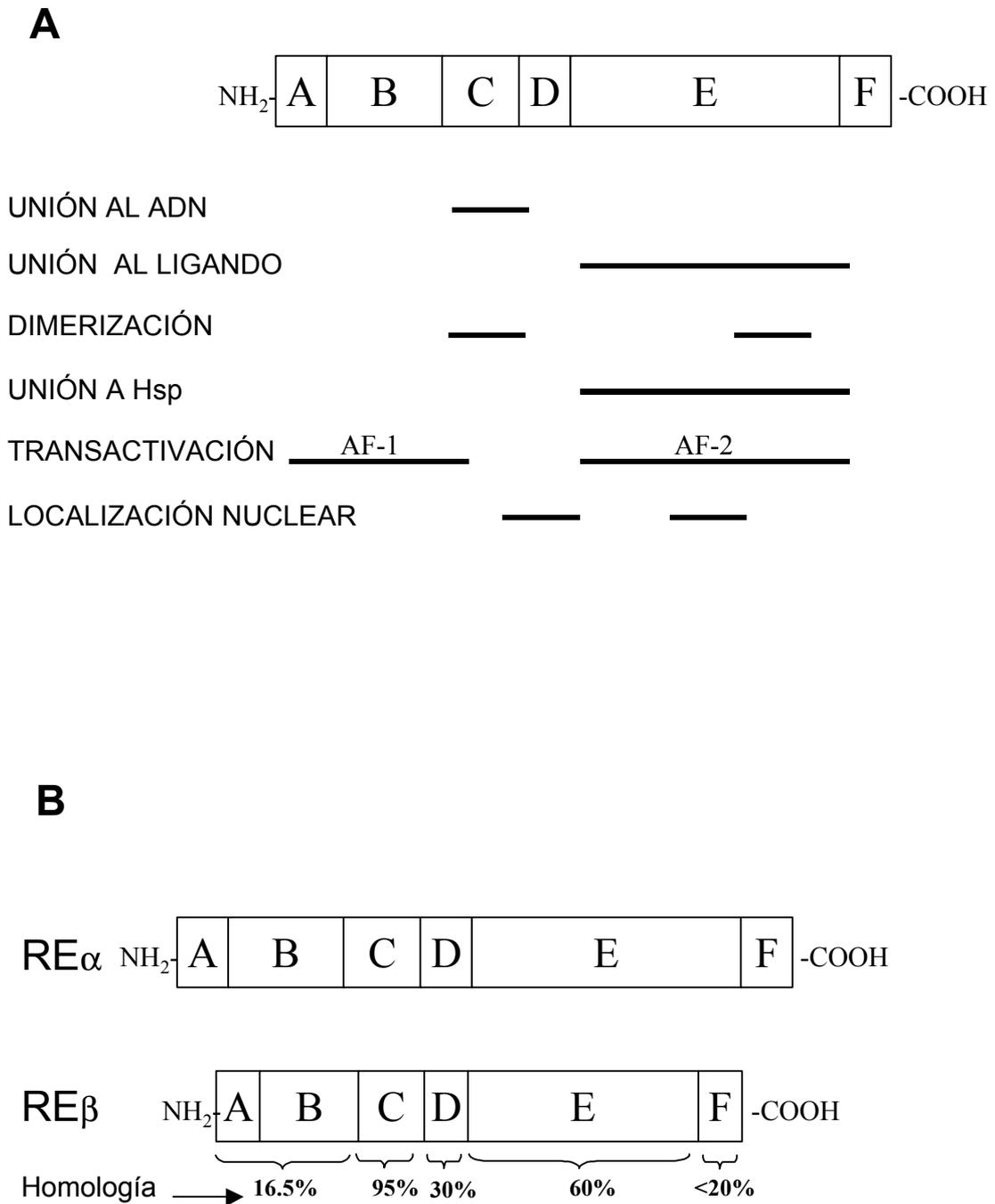


Figura 4. (A). Dominios funcionales de los receptores de hormonas esteroideas (modificada de Tsai y O'Malley, 1994). La estructura del receptor puede ser dividida en seis dominios: A, B, C, D, E y F. La función de cada dominio está indicada por las líneas **(B)** Grado de homología existente entre los subtipos α y β del receptor de estrógenos, RE α y RE β , respectivamente (tomada de Kuiper et al., 1998b).

De esta forma, la actividad de la región AF-2 depende directamente de la interacción del receptor con un ligando, mientras que la función AF-1 es independiente de este hecho, siendo su actividad altamente específica del contexto celular (Webster et al., 1988; Tora et al., 1988; Tora et al., 1989; Bocquel et al., 1989; Berry et al., 1990).

En estos últimos años se han clonado nuevos subtipos del RE, como son el denominado RE β , para diferenciarlo del RE clásico (designado como RE α), a partir de una librería de ADN complementario de próstata de rata (Kuiper et al., 1996), y el recientemente identificado como RE γ , clonado solamente en peces teleosteos (Hawkins et al., 2000). El RE β es capaz de fijar E₂ con una afinidad similar al RE α y de activar la transcripción de genes sensibles a la regulación por E₂. El grado de homología entre ambas proteínas es muy elevado en los dominios de dimerización (95%) y en el de unión a la hormona (60%), siendo sensiblemente menor en el dominio A/B (16%), donde reside la función de transactivación AF-1 (Fig. 4.B) (Kuiper et al., 1998b)

1.1.2. *Localización del receptor estrogénico*

La purificación de los receptores y la posterior obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales ha permitido el desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas que posibilitan el estudio de los RE sin el empleo de ligandos o procedimientos que pueden afectar a su estado de activación. Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica para los receptores de E₂ y Pg, así como para los andrógenos, muestran que su localización, en presencia o ausencia de la hormona, se encuentra en un equilibrio dinámico entre el núcleo y el citoplasma de la célula, siendo este transporte dependiente de energía (Guiochon-Mantel et al., 1991; Kemppainen et al., 1992). Además, es de destacar que cuando el RE se une a su ligando se produce una drástica redistribución de este receptor, pasando a observarse un patrón de agrupamiento puntual en el núcleo (Press et al., 1989; Jensen, 1991). Sin embargo, los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides parecen estar acumulados inicialmente en el citoplasma y se transportan hacia el núcleo cuando se unen a su hormona (Hsu et al., 1992).

1.1.3. Mecanismos de acción del receptor estrogénico

Para ejercer sus efectos reguladores de la transcripción génica los RE, una vez activados, se unen a las secuencias específicas del ADN bajo la forma de dímeros. En ausencia de ligando, el RE existe en un estado conformacional asociado a las proteínas Hsp. Estas proteínas mantienen al RE inactivo impidiendo su dimerización y, por tanto, imposibilitando la asociación con el ADN. La unión de la hormona al receptor provoca un profundo cambio conformacional que implica la disociación de las proteínas Hsp y exposición de los dominios de dimerización. De esta forma, tras la dimerización, el RE es capaz de reconocer y unirse al ERE correspondiente, momento en el cual el dímero es objeto de una reacción de fosforilación por proteínas quinasa nucleares. Esta fosforilación permite la activación por parte del RE de la maquinaria transcripcional de la célula.

El reciente descubrimiento del subtipo RE β ha supuesto un avance en la comprensión de los mecanismos que subyacen en la respuesta celular tras la exposición a E₂. Se abren de esta forma nuevas posibilidades que explican la regulación de la expresión génica por parte del RE. Así el RE se uniría al ADN como homodímeros α , homodímeros β o heterodímeros α - β (Kuiper et al., 1998a y 1998b). Así mismo, los homodímeros β y los heterodímeros α - β podrían reconocer otras secuencias de ADN diferentes a los EREs (Kuiper y Gustafsson, 1997a). Todo ello nos conduce a pensar que los efectos ejercidos por el E₂, e incluso agonistas y antagonistas del mismo, dependerían de:

- a) El tipo de RE expresado en el tejido en cuestión, o del balance RE α /RE β en caso de que se expresen ambos.
- b) De la situación previa del tejido en relación con el tipo de factores de transcripción co-activadores o co-represores que existan en un momento dado.
- c) De la posibilidad de que el RE sea capaz de mediar sus acciones reconociendo otras secuencias de ADN diferentes a los EREs. En este sentido se ha demostrado que el E₂ activa la transcripción de genes acoplados al promotor AP-1 (propio de los factores de transcripción c-

Fos y Jun-c) en líneas celulares transfectadas únicamente con el RE α , mientras que en las mismas células transfectadas con RE β el efecto ejercido por el estrógeno fue de carácter inhibitorio (Paech et al., 1997).

1.2. Acciones no genómicas de las hormonas esteroideas

A lo largo de los últimos años se han descrito toda una serie de efectos ejercidos por hormonas esteroideas que, por sus características, no parecen ocurrir a través del mecanismo descrito anteriormente (Nadal et al., 2001). Se trata de acciones que presentan una latencia extremadamente corta (segundos o minutos), que son insensibles a la presencia de inhibidores de la transcripción y/o síntesis protéica, y que se ejercen en modelos celulares libres de núcleos (McEwen, 1991; Baulieu y Robel, 1995). Por otra parte, el hecho de que sean reproducibles por esteroides incapaces de penetrar en la célula (tras su inmovilización mediante la conjugación con moléculas de gran tamaño), o que se ejerzan sobre membranas aisladas, señala hacia efectos mediados por interacciones directas de las hormonas esteroideas con la membrana plasmática. Se han postulado dos hipótesis para explicar los mecanismos que subyacen en tales acciones (Schumacher, 1990; Baulieu y Robel, 1995; Nadal et al., 2001). El más sencillo consistiría en una interacción de tipo fisicoquímico entre el esteroide y la membrana. La integración de la hormona en la bicapa lipídica, favorecida por el fuerte carácter lipofílico de los esteroides, produciría profundos cambios en las características de la membrana, tales como su permeabilidad, flexibilidad y la fluidez o movilidad de las proteínas integradas en la misma que, en último término, serían las responsables del efecto ejercido por los esteroides. Alternativamente, las hormonas esteroideas podrían unirse a receptores específicos situados en la membrana e inducir alteraciones en los mecanismos de señalización intracelular o en el estado funcional de ciertos canales iónicos. En el caso del sistema nervioso se han descrito efectos rápidos de esteroides endógenos, especialmente E₂ y Pg, aplicados en concentraciones fisiológicas sobre la excitabilidad neuronal (Gee et al., 1988; Wong y Moss, 1990; Gu y Moss, 1998), la secreción de neuromediadores (Dluzen y Ramirez, 1989; Dluzen y Ramirez, 1990) o la

ultraestructura de la membrana neuronal y la actividad exocítica (García-Segura et al., 1994). También se ha probado la existencia de efectos similares en células no nerviosas, y que han aportado pistas acerca de los mecanismos implicados en los mismos (Valverde et al., 1999; Nadal et al., 2000). En los últimos años, y utilizando diferentes preparaciones experimentales, se han aportado evidencias de que ciertas acciones esteroideas sobre la excitabilidad neuronal estarían mediadas por sistemas de segundos mensajeros acoplados a proteínas G (Díaz et al., 1999). La aplicación de E₂ a rodajas de núcleo arqueado de cobayas OVX atenuó la hiperpolarización causada por agonistas opiáceos, probablemente mediante una interacción directa con proteínas G (Larange et al., 1994). Se ha demostrado recientemente que, en células de neuroblastoma, el E₂ conjugado con albúmina (E₂-BSA), y por lo tanto incapaz de atravesar la membrana plasmática, con una latencia de 15 minutos es capaz de activar la transcripción de genes regulados por c-fos incrementando la actividad de quinasas específicas (Watters et al., 1997).

2. Efectos de las hormonas ováricas sobre el metabolismo pineal

La presencia de receptores para hormonas ováricas en la glándula pineal ha sido ampliamente documentada desde la década de los 70 en estudios realizados por el grupo de Cardinali. Mediante ensayos de unión empleando E₂ y Pg marcadas con tritio, se identificaron receptores para ambas hormonas que presentaban una cinética de activación con características similares a las observadas en otros tejidos, tales como el útero u ovario (Cardinali et al., 1975; Vacas et al., 1979). Por otra parte, se ha demostrado la presencia en la glándula pineal del RNAm correspondiente subtipo β del receptor de estrógenos (Shughrue et al., 1997).

2.1. Cambios en la bioquímica pineal durante el ciclo del estro

Durante el ciclo ovárico, en la llamada la fase de proestro, las concentraciones plasmáticas de E₂ son máximas, siendo en este momento donde se observan las variaciones más profundas que afectan al metabolismo pineal (Fig. 6). Varios autores han descrito una disminución en los niveles nocturnos de

melatonina pineal en este estado (Cardinali et al., 1974; Johnson et al., 1982; Moujir et al., 1990a). También se ha encontrado una reducción en la actividad AC y contenido de AMPc en glándulas obtenidas de ratas en proestro e incubadas *in vitro* con NA (Weiss y Crayton, 1970; Davis, 1978).

2. 2. Efecto de la ovariectomía y la administración de hormonas ováricas

Con el objeto de confirmar si los efectos anteriormente descritos están mediados por los esteroides ováricos, se han estudiado las consecuencias de su eliminación mediante ovariectomía bilateral (OVX) y su posterior reposición en forma de implantes subcutáneos o inyecciones de E₂ y Pg. La OVX afecta a la glándula pineal desde un punto de vista morfológico y funcional. Esta manipulación quirúrgica produce un incremento en el peso de la glándula (Fiske et al., 1962; Sahu y Chakraborty, 1986), así como claras evidencias de hipertrofia (Gupta, 1968; Sahu y Chakraborty, 1986). Los cambios en la bioquímica pineal que acompañan a la OVX son diversos y señalan, al igual que las evidencias reseñadas en el apartado anterior, hacia una regulación de carácter inhibitorio ejercida por las hormonas ováricas. Tras la OVX se produce un incremento en la producción nocturna de melatonina (Okatani et al., 1997; Ozaki et al., 1978), en la actividad sNAT (Okatani et al., 1998a y 1998b), en la actividad AC en respuesta a la estimulación con NA (Weiss y Crayton, 1970), y en los niveles de AMPc producidos en respuesta a la estimulación α_1 - β -adrenérgica. Utilizando otra estrategia experimental, en nuestro laboratorio hemos abordado el estudio de la regulación esteroidea de la función pineal antagonizando químicamente las acciones del E₂, y observando posteriormente su efecto sobre la respuesta del pinealocito a la estimulación adrenérgica (Alonso et al., 1995). Con este fin se cuantificaron los niveles de AMPc producidos tras la estimulación adrenérgica de células pineales procedentes de ratas hembra en proestro tratadas con el antiestrógeno tamoxifeno (Tx) y el antiprogéstágeno RU486. Los resultados obtenidos mostraron que la administración de Tx o RU486 incrementó la respuesta β o α_1 - β -adrenérgica, existiendo potenciación α_1 - β únicamente cuando se antagonizó la acción de ambas hormonas ováricas con la combinación Tx+RU486 .

Con respecto a los efectos producidos tras la administración de E₂ a animales OVX, los datos aportados por diferentes autores son contradictorios debido a las diferencias en las dosis y pautas de tratamiento utilizadas (Alonso et al., 1993). La administración de E₂ suprime la hipertrofia producida por la OVX (Sahu y Chakraborty, 1986), reduce los niveles nocturnos de melatonina (Alexander et al., 1970; Okatani et al., 1997), y reduce la actividad sNAT incrementada tras la OVX (Okatani et al., 1998a y 1998b). El tratamiento con E₂ de ratas OVX bloquea el incremento en los niveles de melatonina pineal inducidos por la administración de isoproterenol (Moujir et al., 1990a), así como los niveles séricos de melatonina y la excreción urinaria de su principal metabolito, la 6-sulfatoxymelatonina, tras el mismo tratamiento (Yie y Brown, 1995). Así mismo, el estrógeno administrado *in vivo* inhibe la activación de la AC y el aumento en los niveles de AMPc en pineales estimuladas *in vitro* con NE (Weiss y Crayton, 1970).

Por último, cabe reseñar que estudios previos de nuestro laboratorio han demostrando, *in vitro*, que concentraciones de estradiol de 0.1-10 nM durante 48 horas de exposición, producen una reducción en la actividad del enzima sNAT y la secreción de melatonina, así como de la acumulación de AMPc en respuesta a la estimulación adrenérgica (Sánchez, 1999). El estradiol, a las mismas dosis e idénticas condiciones experimentales, no afectó el aumento en la producción de AMPc inducido por forskolina (activador de la AC), lo que implicaría que las acciones estrogénicas en relación con esta vía se ejercen en algún nivel previo a la adenilato ciclasa (Hernández et al., 2001). Estos datos indican que los niveles circulantes de estradiol son capaces de modular la respuesta del pinealocito a la estimulación adrenérgica, si bien no están claros los mecanismos de acción implicados ni los receptores o vías de señalización que pueden mediar estas acciones.

Objetivos

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los esteroides ováricos ejercen efectos moduladores de la síntesis y liberación de melatonina pineal, inducidas por estimulación adrenérgica (Hernández et al., 2001). Teniendo en cuenta este efecto, hemos planteado nuestro trabajo a partir de la hipótesis de que el estradiol es capaz de controlar la actividad pineal a través de una modulación del número o estado funcional de los receptores de membrana que reciben la aferencia noradrenérgica, lo que afectaría las diferentes señales desencadenadas por la activación de estos receptores. Para abordar el estudio hemos utilizado como modelo experimental tanto células pineales dispersas como glándulas enteras procedentes de ratas hembra ovariectomizadas y expuestas, *in vivo* o *in vitro*, a la acción estrogénica. Con este planteamiento nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Dado que en nuestro laboratorio se ha demostrado que la exposición de células pineales a 17β -E₂ reduce su sensibilidad de los receptores α_1 - y β -adrenérgicos a sus agonistas específicos, se diseñaron experimentos destinados a:

1. Definir los rangos de dosis fisiológicas de E₂ a los cuales se produce el efecto sobre las vías de señalización intracelular.
2. Caracterizar el curso temporal, lugar de acción y esteroespecificidad del efecto del E₂.
3. Estudiar las consecuencias de tales acciones sobre la cinética enzimática de la sNAT y metabolitos pineales.
4. Identificar la diana mediadora del efecto del E₂.

5. Identificar y estudiar la distribución subcelular de los subtipos del RE (α y β) presentes en los pinealocitos, así como su dinámica en presencia de E_2 y/o antiestrógenos.

Material y Métodos

ANIMALES

Para la preparación del cultivo celular y estudios en el animal entero, las glándulas pineales se obtuvieron a partir de ratas hembra de la cepa *Sprague-Dawley*, mantenidas en un ciclo luz-oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 7:00 a.m.; 60-80 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$), con temperatura controlada (23 ± 2 °C) y acceso libre a agua y pienso estándar de laboratorio. A la edad de 20 días los animales fueron ovariectomizados bilateralmente (OVX) bajo anestesia con ketamina-xilazina y sacrificados 48 horas después por decapitación. Una vez extraídas, las glándulas pineales fueron inmediatamente sometidas al procedimiento de dispersión enzimática, tal y como se describe a continuación.

CULTIVO CELULAR

1. Dispersión de las células pineales

La preparación del cultivo se llevó a cabo siguiendo el método establecido previamente por Buda (Buda y Klein, 1978), modificado para permitir la adherencia de las células a la superficie de cultivo. Las glándulas pineales fueron sometidas a un proceso de digestión enzimática a 37°C durante 30 minutos en medio Dulbecco modificado (DME, Gibco BRL) con 1.25 mg/ml de Tripsina (10100 unidades/mg de proteína), 1% de L-glutamina, 1 mg/ml de albúmina bovina, 1.33 mg/ml de EGTA, 0.1 mg/ml de ácido ascórbico, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina. La digestión fue detenida por adición al medio de 1 ml de suero bovino fetal (FBS, Sigma España) seguida de una centrifugación (1000 rpm, 10 minutos). Eliminado el sobrenadante, las glándulas fueron dispersadas mecánicamente en un medio de igual composición, pero sin tripsina, mediante sucesivos pases a través de una pipeta. Los pinealocitos obtenidos de este modo fueron separados del medio de dispersión por centrifugación (1000 rpm, 5 minutos) y resuspendidos en un volumen de medio suficiente para obtener entre 180000 y 200000 células/ml. El medio

utilizado fue DME (Gibco BRL, sin rojo de fenol) conteniendo penicilina y estreptomicina (100 U/ml), FBS (10%) y L-glutamina (1%). La suspensión celular fue distribuida en placas (previamente tratadas con poli-D-lisina para permitir la adherencia de las células) a razón de 1 ml en cada una de ellas. Las células pineales se mantuvieron en cultivo a una temperatura de 37 °C y bajo atmósfera controlada, con un 95% de aire y 5% de CO₂. Durante un primer período de 24 horas los pinealocitos no sufrieron ningún tipo de manipulación farmacológica, en espera de la completa regeneración de la superficie celular dañada y posibilitándose, además, la completa degeneración de los terminales noradrenérgicos. Los medios utilizados durante el proceso de dispersión y posterior cultivo de las células carecieron en todo momento de rojo fenol debido a sus posibles efectos estrogénicos (Berthois et al., 1986).

2. Tratamiento con las hormonas ováricas y agonistas adrenérgicos

Salvo en aquellos experimentos donde se indique lo contrario, en los experimentos con cultivos primarios, las células se incubaron con 17- β estradiol (E2), a las concentraciones que se indique en cada caso, cambiando el medio de cultivo cada 24 horas. Las hormonas fueron disueltas en etanol y sucesivamente diluidas de modo que, una vez añadidas al medio de incubación o inyectadas, la concentración final de etanol en el mismo fue siempre del 0.001% o menor. En el caso de experimentos in vivo, los animales se empezaron a tratar con las hormonas 48 horas después de la ovariectomía, administrándoles subcutáneamente inyecciones agudas de E2 en volúmenes de 0.1 ml de Polietilenglicol. Estas inyecciones fueron dadas durante dos días seguidos, inmediatamente antes de apagarse la luz, mientras que la única inyección de Pg fue administrada 7 horas antes de la decapitación del animal, con lo que se simulaban las fluctuaciones cíclicas en estas hormonas durante el ciclo del estro. Las concentraciones de E2 utilizadas se encuentran por lo general comprendidas dentro del rango fisiológico correspondiente a sus niveles plasmáticos durante la fase de proestro en la rata hembra (Smith et al., 1975). Tal y como muestra la figura 5 los, niveles séricos de E2 inician un incremento paulatino durante la fase de diestro, alcanzando el máximo

valor durante la tarde del proestro, y descendiendo hasta alcanzar los niveles basales en la mañana del estro.

Con objeto de explorar el efecto de los esteroides ováricos sobre los sistemas de segundos mensajeros asociados a los receptores adrenérgicos, finalizado el tratamiento con las hormonas los pinealocitos, o las glándulas enteras en el caso de los experimentos in vivo, fueron estimulados in vitro con el agonista β -noradrenérgico isoproterenol (ISO, 10^{-6} M), el agonista $\alpha 1$ adrenérgico fenilefrina (PHE, 10^{-6} M), o la norepinefrina (NE, agonista α/β -adrenérgico, 10^{-6} M), durante un periodo de 15 y 10 minutos, para células dispersas o glándulas enteras respectivamente. Las concentraciones de los agonistas utilizadas fueron elegidas en virtud a obtener la máxima respuesta sin que ello derivara en efectos inespecíficos.

También en algunos experimentos se utilizó CTx (10^{-5} g/ml, 30min.), con objeto de estimular directamente las proteínas Gs. Finalmente, a lo largo del periodo de exposición a las hormonas ováricas, el FBS fue sustituido en el medio de cultivo por suero fetal bovino sometido a un tratamiento con carbón activo para la eliminación de su contenido en esteroides (FCS-DLP, Sigma España).

3. Preparación de las placas para el cultivo celular

Los pinealocitos se incubaron en placas de 35 x 10 mm (8 cm² de área; Corning, Sigma España) impregnadas con poli-D-lisina (PLD; Sigma, PM=70,000-150,000 D), polímero que facilita la adherencia de las células a la superficie de cultivo.

Para el tratamiento de las placas, la superficie de las mismas se cubrió con aproximadamente 500 μ l de una solución acuosa estéril de PLD con una concentración de 10^{-4} g/ml. Después de eliminar por aspiración la solución sobrante y tras 1 hora a temperatura ambiente, el área de cultivo quedó recubierta de una fina película de PLD. A continuación las placas se lavaron con 1 ml de agua estéril quedando listas para su uso. En el caso de las incubaciones de las glándulas enteras se utilizaron placas de 24 pocillos sin tratar con poli-D-lisina.

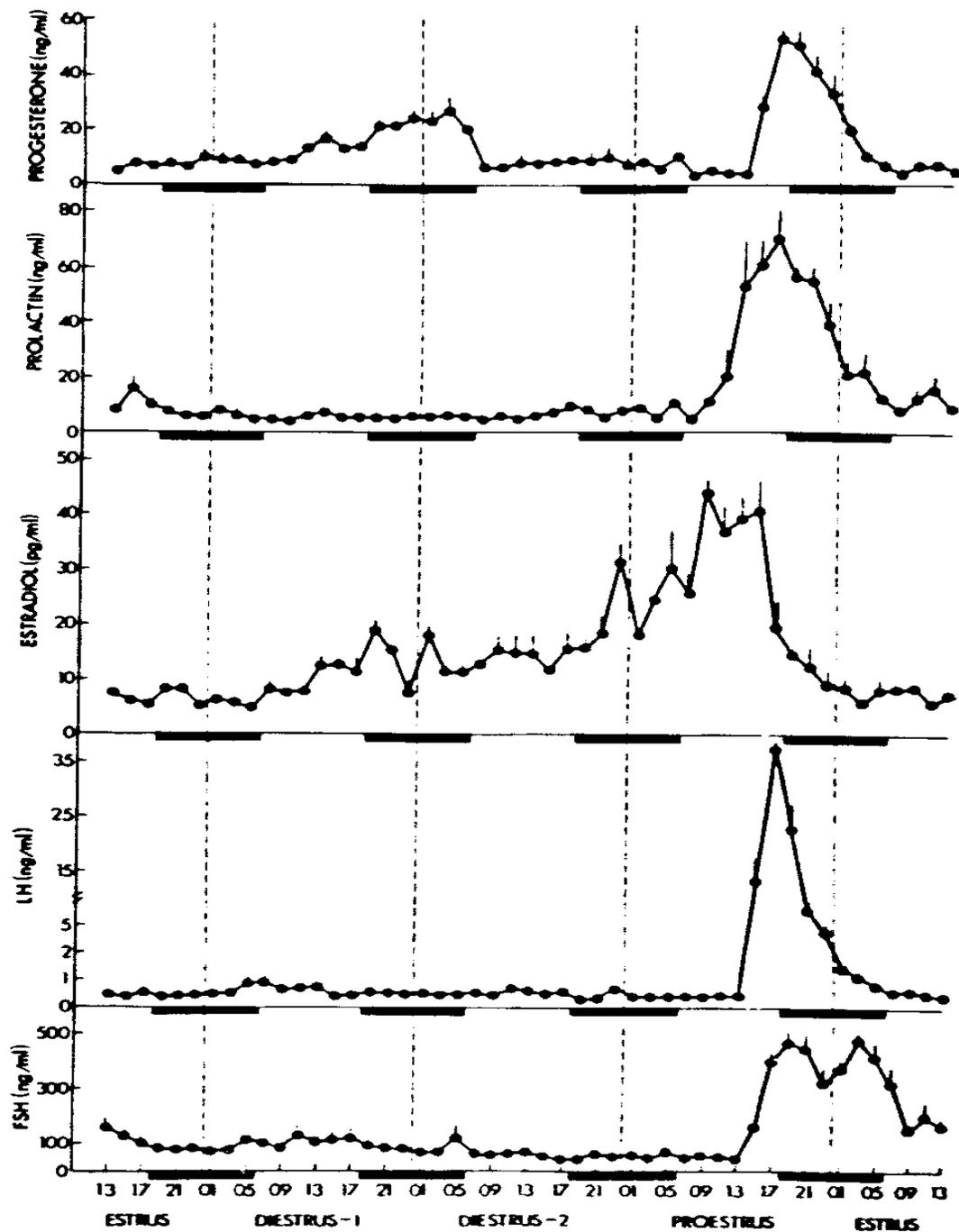


Fig. 5. Fluctuaciones cíclicas de estradiol, progesterona, prolactina, hormona luteinizante (LH) y hormona foliculo estimulante (FSH) durante el ciclo del estro en la rata. La figura muestra las concentraciones plasmáticas de las hormonas obtenidas a intervalos de 2 horas durante las cuatro fases del ciclo del estro. (Tomada de Freeman, 1994).

MÉTODOS BIOQUÍMICOS

1. Medida de los niveles intracelulares de AMPc

Tras el tratamiento de los pinealocitos con los esteroides ováricos en los tiempos y dosis indicados en cada caso, las células o las glándulas enteras se estimularon con los agonistas adrenérgicos durante 10 ó 15 minutos (Vanecek et al., 1985). Con el fin de evitar la degradación del AMPc formado, la actividad de la fosfodiesterasa fue inhibida mediante incubación de las células con 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 10^{-4} M, 60 minutos), antes de proceder a la estimulación adrenérgica. La incubación se detuvo eliminando el medio y recogiendo en 200 μ l de una solución tampón, pH = 5.8, compuesta por acetato sódico 0.05 M y 0.02% de albúmina bovina (Amersham, RPN225). Con objeto de conseguir una total rotura de la membrana plasmática y liberación del contenido intracelular, las muestras se sometieron a un proceso de hervido al “baño maría” durante 5 minutos, seguidos de una homogeneización mediante ultrasonidos (50 W; 15 seg).

La determinación de los niveles de AMPc se realizó mediante una técnica inmunoenzimática adaptada para ser llevado a cabo en microplacas (EIA RPN225, Biotrak, Amersham). Este método está basado en la competición establecida por la unión a un anticuerpo entre el AMPc presente en la muestra problema y una cantidad conocida de AMPc ligado a peroxidasa añadido a la misma. El total de AMPc-peroxidasa ligada al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de AMPc contenido en la muestra, y se determina mediante la incubación con tetrametilbencidina (TMB). El TMB es oxidado por la peroxidasa, dando origen a un complejo de color azul cuantificable mediante espectrofotometría y que presenta un máximo de absorción a 630 nm. Para la lectura de la absorbancia se empleó un lector de microplaca (Mod. EL11s, Bio-Tek Instruments, U.S.A).

1.1. Selección de protocolos para la medición de AMPc en glándulas enteras

Con objeto de trabajar siempre en rangos lineales de acumulación de estas señales en los distintos modelos experimentales, hemos querido optimizar un protocolo de estimulación y recogida para la medición del AMPc intracelular, en el caso de glándulas pineales sin dispersar.

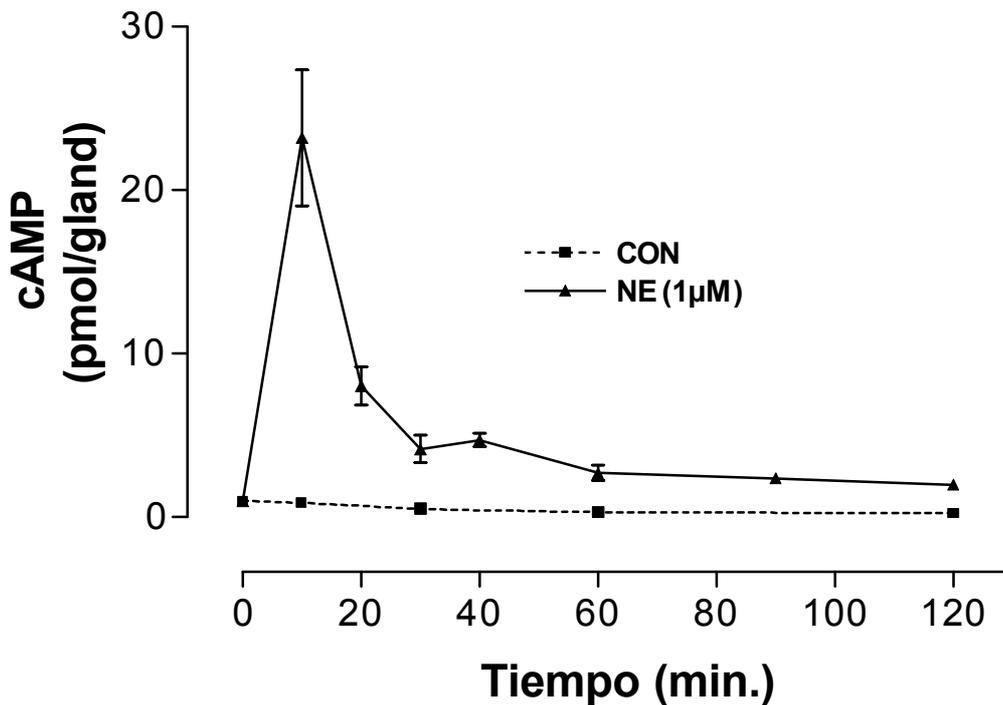


Figura 6: Curso temporal de la acumulación de AMPc intracelular en glándulas sin dispersar tras estimulación adrenérgica con norepinefrina (NE, 10^{-6} M), o sin estimular (CON). Los datos se representan como la media \pm SEM de 8 glándulas enteras.

En la figura 6 se puede observar un punto máximo en la acumulación de AMPc a los 15 min. tras la estimulación adrenérgica en el caso de la glándula entera, y una disminución paulatina de estos niveles a tiempos mayores. Ello nos ha llevado a seleccionar el tiempo de estimulación de 10 min. como el idóneo para la estimulación y posterior cuantificación de este segundo mensajero en glándulas sin dispersar, asegurándonos así hacer la medición en condiciones de máxima linealidad con el fin de evitar en todo momento la saturación de la señal.

2. Medida de la actividad Fosfolipasa C

La actividad PLC se estudió midiendo la producción de [^3H]-inositoles fosfato ([^3H]-IPs) en células pineales incubadas con [^3H]-*myo*-inositol (17,1 Ci/mmol de actividad específica, Amersham, TRK911 B32), el cual se incorpora al metabolismo celular como fosfatidil inositol 1,4,5 trifosfato, que sirve como sustrato de la enzima (Berridge et al., 1982). Los pinealocitos fueron incubados durante 12 horas con [^3H]-*myo*-inositol $2,15 \cdot 10^{-5}$ M ($3 \cdot 10^{-6}$ Ci/placa), y seguidamente estimulados con PHE 10^{-6} M durante 1 hora. Este periodo de estimulación fue elegido debido a que previamente se hizo un estudio temporal donde se fueron tomando muestras a tiempos sucesivos.

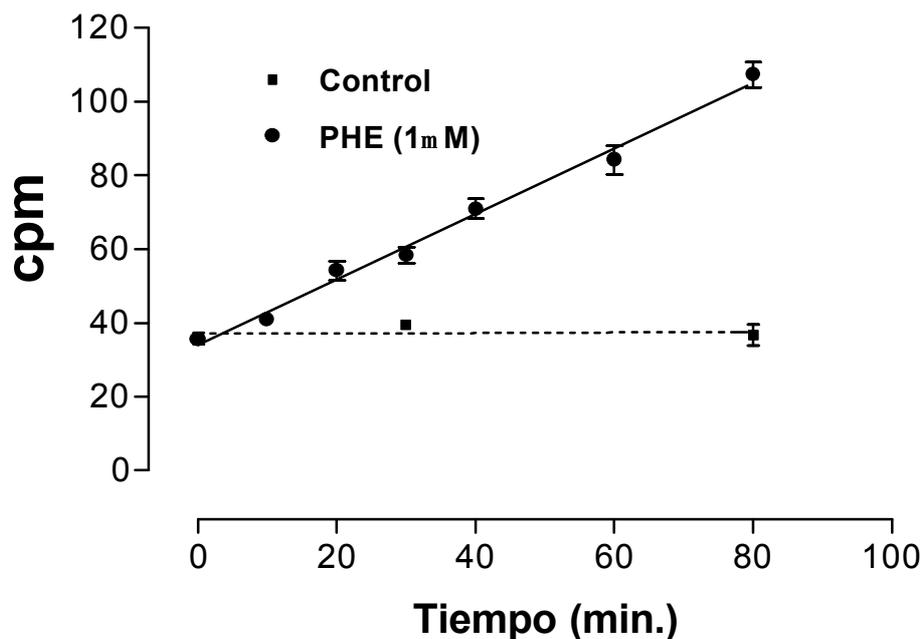


Fig. 7: Curso temporal de la estimulación α_1 -adrenérgica de pinealocitos dispersos con PHE (10^{-6} M), midiendo la hidrólisis de fosfoinositoles (IP). Células pineales procedentes de ratas OVX fueron dispersadas e incubadas con medio de cultivo durante 48 horas. Doce horas antes de llevar a cabo la estimulación adrenérgica, los pinealocitos se trataron con [^3H]-*myo*-inositol ($3 \cdot 10^{-6}$ Ci/placa), tras lo cual fueron incubados con PHE o vehículo (agua, Control) durante los distintos periodos de tiempo. Para prevenir la degradación enzimática de los [^3H]-IPs, diez minutos antes de proceder a la estimulación α_1 -adrenérgica, las células se trataron con CLi 10^{-2} M, un inhibidor de las fosfatasas. Una vez recolectados los pinealocitos, y tal como se especifica en "*Material y Métodos*", se procedió a la extracción y cuantificación de los [^3H]-IPs formados. La adición de PHE al medio elevó significativamente los IPs totales ($r = 0.99$, $P < 0.0001$). Los datos se representan como la media \pm SEM.

Con este estudio se comprobó que la acumulación de IPs era lineal como mínimo hasta los 80 min. tras la estimulación con PHE 10^{-6} M (Fig. 7). Así pues, hemos considerado que la elección de 60 min. de estimulación con PHE constituiría un tiempo adecuado para la realización de las determinaciones, puesto que este periodo temporal se sitúa en el intervalo de máxima linealidad de la pendiente, posibilitando una acumulación suficiente para poder hacer determinaciones fiables en las glándulas sin estimular correspondientes a los controles.

Además, con el fin de evitar la degradación de los [3 H]-IPs formados, la actividad de las fosfatasas fue inhibida con LiCl 10^{-2} M añadido al medio de cultivo 10 minutos antes de proceder a la estimulación α_1 -adrenérgica. Finalizada ésta, las células fueron lavadas dos veces con 1 ml de PBS a 37°C y recogidas en 1 ml de metanol a una temperatura de 4-5°C.

La separación de los [3 H]-IPs se llevó a cabo mezclando el volumen anterior de metanol con 0.5 ml de agua y 1 ml de cloroformo. Tras centrifugar las muestras durante 10 minutos a 3,000 rpm los [3 H]-IPs quedan contenidos en la fase acuosa superior, de la cual se recogió 1 ml. Los restos de cloroformo presentes en esta alícuota fueron separados mediante una nueva centrifugación tras añadir a la misma 2 ml de agua.

A continuación, 2.5 ml del extracto acuoso se pasaron a través de columna que contenía una resina de intercambio iónico (AG 1-X8, Bio-Rad, Madrid, España), donde quedaron retenidos los inositoles. Tras lavar dos veces la columna con 5 ml de agua, los [3 H]-IPs fueron eluidos con 5 ml de una solución de ácido fórmico 0.1 M y formiato amónico 0.1 M, mezclándose entonces con 10 ml de líquido de centelleo (*Fórmula-989*, Ref. NEF-989, Dupont).

La emisión β se determinó mediante la medida de las cpm (cuentas por minuto) en un contador de centelleo con una eficiencia de contaje del 40% (Mod. LS3801, Beckman, U.S.A).

3. Medida de la actividad sNAT

Para el estudio del efecto ejercido por los esteroides ováricos sobre la actividad sNAT pineal, las células o glándulas enteras expuestas a E_2 en las dosis y tiempos indicados se estimularon con 10^{-6} M de ISO o 10^{-6} M de NE durante un período de 6 horas, tiempo necesario para obtener la máxima activación de la enzima *in vitro* (Klein et al., 1983). Finalizada la incubación con los agonistas adrenérgicos, las células fueron recogidas en 200 μ l de sacarosa 0.25 N a 4°C, siendo sometidas a un proceso de homogeneización con ultrasonidos (50 W, 15 seg).

El análisis de la actividad sNAT se llevó a cabo en una alícuota del homogenado anterior midiendo la cantidad de N-acetil-triptamina (NAT) formada enzimáticamente a partir de una cantidad de triptamina añadida al medio de incubación como sustrato (Fajardo et al., 1992). La mezcla de incubación, en un volumen final de 100 μ l, estuvo compuesta por 50 μ l del homogenado problema, 25 μ l de AcetilCoA 4×10^{-3} M y 5 μ l de EDTA 105 mM. La reacción se inició añadiendo 25 μ l de triptamina 8×10^{-3} M como sustrato. Transcurridos 30 minutos de incubación, ésta se detuvo con 1 ml de una mezcla de tolueno y alcohol isoamílico acidificado (99:1 vol/vol; alcohol isoamílico acidificado con HCl 1 M 3:1 vol/vol) en un baño de hielo a 4°C durante 10 minutos. Tras 25 minutos de agitación y posterior centrifugación a 3,000 rpm durante 10 minutos, fracciones de 500 μ l de la fase orgánica superior se llevaron a sequedad en un sistema de centrifugación a vacío (Speedvac Concentrator, Savant Ins, Farmingdale, N.Y., USA). Finalmente, el residuo se redisolvió en 100 μ l de la fase móvil utilizada en la detección cromatográfica de la NAT. Para dicha determinación se empleó un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia con detección fluorimétrica (HPLC-FD). Las alícuotas preparadas como se describió anteriormente se inyectaron en una columna de fase reversa (C-18, Spherisorb ODS de 5 μ m, 12.5 x 4.5 mm, Scharlau, Barcelona). El eluyente estuvo compuesto por 0.1 M de ácido acético, 0.1 M de acetato sódico, 5×10^{-2} g/l de EDTA y 15% de acetonitrilo (vol/vol) en agua desionizada y todo ello ajustado a un pH de 5.2.

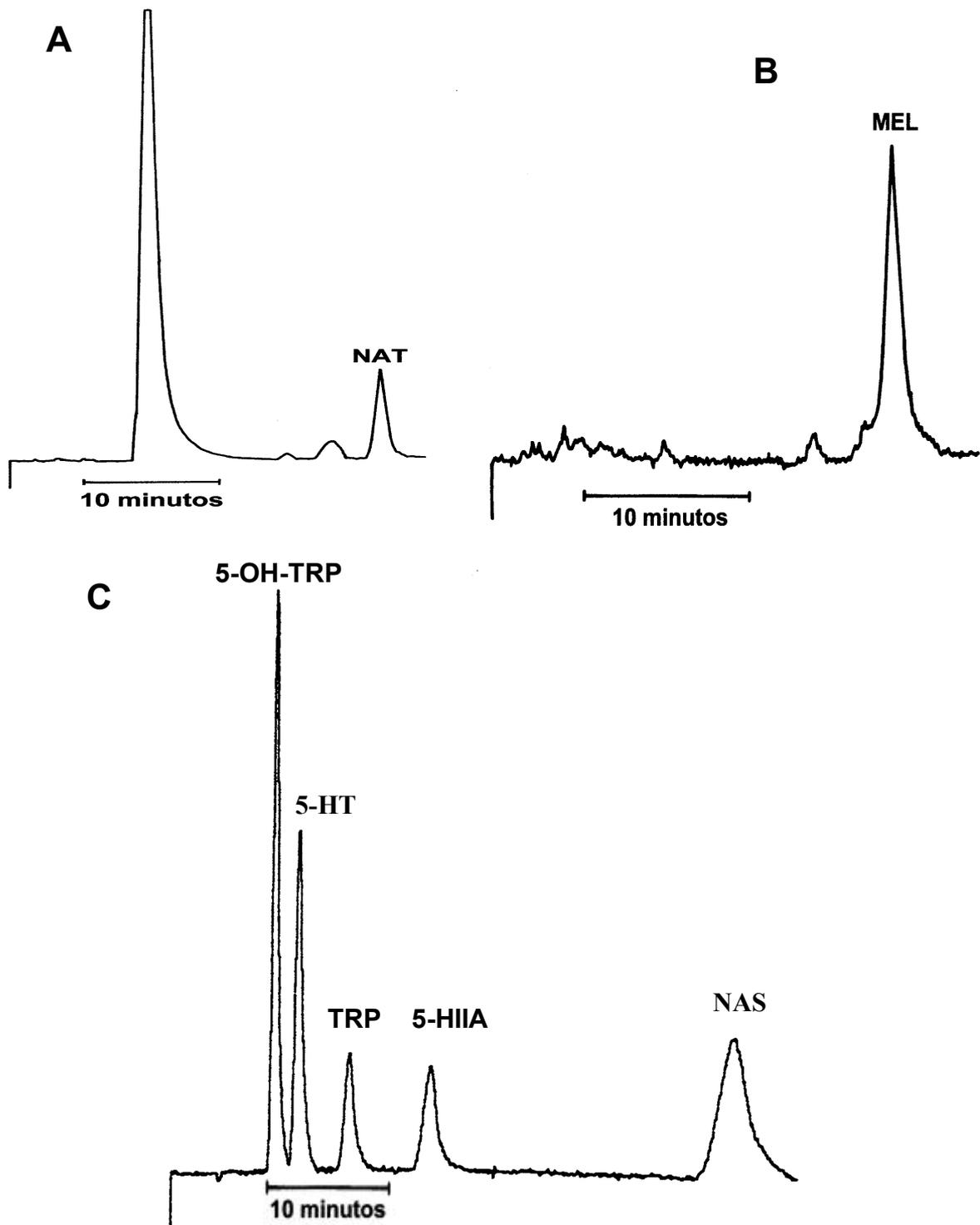


Fig. 8. Cromatogramas que muestran la separación de la Serotonina-N-acetil triptamina formada durante el ensayo de actividad de la enzima (sNAT) (A), de la melatonina liberada al medio (B) y de los indoles intracelulares 5-Hidroxitriptófano (5-OH-TRP), serotonina (5-HT), triptófano (TRP), 5-Hidroxindolacético (5-HIAA), N-acetilserotonina (NAS) (C). La identificación de las sustancias se llevó a cabo mediante el tiempo de retención, que fue de 21 min. para la sNAT, 19 min. para la melatonina, de 9 min. para el 5-OH-TRP, 11 min. para la 5-HT, 15 min. para TRP, 22 min. para el 5-HIAA y 50 min. para la NAS.

Durante el proceso analítico se procedió a la degasificación del eluyente mediante la perfusión constante de helio a razón de 20 ml/minuto. El sistema se mantuvo a un flujo de 1 ml/minuto (bomba Waters mod. 600E, Millipore Ibérica, S.A., Barcelona). Para la detección de la NAT se utilizó un detector de fluorescencia (Mod. LS 40, Perkin Elmer Ltd, Bucknighanshire, U.K) con las longitudes de onda de excitación y emisión ajustadas a 285 y 360 nm, respectivamente. La identificación y cuantificación de la NAT presente en la muestras se realizó mediante el tiempo de retención en la columna (21 minutos), en las condiciones descritas y la altura del pico obtenido (Fig. 8 A); a tal efecto se empleó un sistema de integración de señales Hewlett Packard modelo HP3396.

4. Medida de los niveles de indoles

En las muestras en las que se analizó la actividad sNAT, se midió también la cantidad de Indolaminas presentes en el interior celular que intervienen en la ruta biosintética. Finalizada la incubación con los agonistas adrenérgicos, fueron recogidos en 200 μ l de sacarosa 0.25 N a 4°C, siendo sometidos a un proceso de homogeneización con ultrasonidos (50 W, 15 seg). De estos 200 μ l de homogenado, 50 μ l fueron destinados para la determinación de la actividad sNAT y a los 150 μ l restantes se les añadió ácido perclórico hasta una concentración final de 0,1 M y 4×10^{-3} M de metabisulfito sódico como antioxidante. Posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 12000 rpm y el sobrenadante fue recogido para la determinación de estas indolaminas mediante HPLC-FD (Calzadilla et al., 1987). Para ello, se utilizó una fase móvil compuesta por 0.1 M de fosfato monosódico, 10 % de Metanol y 10^{-4} M de Na₂-EDTA, todo ello en agua desionizada y tamponada a un pH de 4,5. La configuración del sistema cromatográfico y condiciones de análisis empleadas fueron esencialmente las mismas que las descritas en los apartados anteriores. La única diferencia fue que la determinación fluorimétrica de los indoles pineales se realizó a una longitud de onda de emisión de 345 nm. Bajo las condiciones de análisis establecidas, la serotonina (5-HT), 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA), presentaron un tiempo de retención en columna de 7 y 10 minutos, respectivamente. (Fig. 8 C)

5. Medida de la capacidad de ligado del β_1 -adrenoceptor

Un mínimo de 3 millones de células pineales fueron disgregadas en un homogenizador de mano con vástago de teflón y vaso de vidrio enfriado constantemente en hielo. La solución de homogenización fue un tampón tris-HCl (5×10^{-2} M, pH 7.4), que contiene 10^{-3} M de Fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF), 5×10^{-5} g/ml de Leupeptina y 10^{-3} M de EGTA. Este homogenizado fue centrifugado a $100.000 \times g$ durante 1h a 4°C .

El precipitado fue lavado 2 veces con el tampón de homogenización y resuspendido posteriormente en dicha solución a una concentración de proteínas de 2×10^{-3} g/ml, fraccionándose en alícuotas de 1ml y conservándose a -70°C hasta ser usado. La concentración de proteínas en la fracción aislada de membrana fue realizada mediante el método de Bradford, (1976); usando albúmina de suero bovina como estandar $50 \mu\text{g}$ de membranas fueron incubadas en un medio de $100 \mu\text{l}$ de volumen total conteniendo para los experimentos de isotermas de saturación $2,5 \times 10^{-11}$ - 8×10^{-10} M de [^{125}I]-Iodocianopindolol (ICYP, 2,200 Ci/mmol. New England Nuclear); en ausencia (unión total) o en presencia (unión no específica) de propranolol 5×10^{-5} M (un antagonista específico β -adrenérgico). Para los experimentos de cinética temporal y curvas de proteínas se usó una concentración de 3×10^{-10} M de [^{125}I]-ICYP. Después de la incubación en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos, se le añadió 2 ml de Tris-HCl frío y el contenido de cada tubo fue rápidamente filtrado en un sistema de filtración por vacío con membranas hidrofílicas de $0,45 \mu\text{m}$. (MultiScreen, Millipore). Cada filtro fue lavado cuatro veces con Tris-HCl frío y las membranas con el producto radiactivo recortadas y medida la radiactividad de cada una en un contador gamma, con un 56% de eficiencia (Mod.5500, Beckman, U.S.A). La unión específica del ICYP fue definida como la cantidad de ICYP unido en ausencia del competidor menos lo que se une en presencia de 5×10^{-5} M de propranolol. La unión específica fue aproximadamente el 80% de la unión total.

6. Análisis de ARN por "RT-PCR"

Esta técnica permite la detección y análisis de ARNs de un modo rápido y sencillo. Además, se trata de una técnica que posibilita medir con cierta fiabilidad nuestros ARN específicos ya que ha demostrado tener éxito en muestras de ARN pequeñas (Kawasaki, 1990). Por estas razones nos inclinamos en un principio por la "Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction" (RT-PCR) que, dado el pequeño tamaño de las glándulas pineales de rata, nos permitiera analizar el ARN de ratas individuales.

La técnica consta de tres fases: extracción de ARN, síntesis de ADNc y amplificación de un fragmento de un ADNc concreto mediante uso de una pareja de cebadores o "*primers*" específicos (Fig. 9).

6.1. Extracción de ARN total

Hasta el momento de la extracción de ARN la glándula pineal y los tejidos control fueron mantenidos en solución desnaturante (solución D), que contiene 4 M isotiocianato de guanidina, $2,5 \times 10^{-2}$ M citrato sódico, 0.5 % N-lauril sarcosinato y 10^{-1} M β -mercapto-etanol. Las muestras fueron rápidamente congeladas a -80 °C hasta su procesamiento. La homogeneización se llevó a cabo mediante ultrasonidos.

Para estas técnicas de análisis de ARN por RT-PCR en todos los tejidos estudiados la extracción de ARN total se realizó según el método descrito por (Chomczynski y Sacchi, 1987). El **rendimiento** de ARN extraído fue determinado por espectrofotometría de UV (DU-640 Spectrophotometer, Beckman Instruments, CA). Se empleó para ello un método ya descrito (Sambrook et al., 1989), en el cual se estima el grado de pureza empleando como criterio la relación de absorbancias 260/280 nm; considerando que en las preparaciones puras de ARN esta relación debe ser 2.0. Durante todos los procedimientos con ARN se tomaron las debidas precauciones para evitar la **contaminación con ARNsas** (Blumberg, 1987). En especial se usó siempre guantes y material plástico estéril tanto en la extracción del ARN como en la preparación de las disoluciones.

6.2. Síntesis de ADNc

Todas las reacciones de síntesis de ADN complementario (ADNc), necesarias para los distintos experimentos se efectuaron siguiendo procedimientos estándar, utilizando oligo(dT) como cebador (Krug et al., 1987). Esto permite generar una muestra de ADNcs representativa de la población de ARNms, y además constituye un primer paso de selección ya que sólo se transcriben los ARNms (con cola poli(A)). Idealmente, la reacción de síntesis funciona de manera óptima con 5 µg de ARN; sin embargo, rara vez un par de glándulas pineales rendía 5 µg. No obstante la variación en el rendimiento de ARN entre muestras no fue grande, por lo que no era de esperar tampoco variaciones en la cantidad de ADNc. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl, durante 2 h a 42 °C.

6.3. Reacciones de PCR

Las reacciones se realizaron en un volumen de 50 µl, con 1 U de Taq ADN polimerasa, 10^{-4} M de cada dNTP (A, T, G, C), 0,5 µM de cada cebador y 1 µl de ADN molde (de concentración variable), en un buffer con 10^{-2} M Tris-HCl, pH 9.0, 1.5×10^{-3} M MgCl₂ y 5×10^{-2} M KCl. La fase de desnaturalización se efectuó a 94 °C, y la fase de polimerización a 72 °C, ambas durante 1 min. Usualmente se efectuaron 30 ciclos en el proceso de amplificación.

La temperatura de anillamiento es específica para cada pareja de cebadores y se menciona en cada apartado. Esta temperatura fue estimada *a priori* calculando la temperatura media de desnaturalización de cada cebador mediante la fórmula empírica $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ (Innis et al. 1990).

6.4. Diseño de los cebadores

Basándonos en la bibliografía o en cada una de las secuencias del ADN genómico dadas en GEN-BANK, y teniendo en cuenta los criterios de selección de cebadores para RT-PCR (Hernández et al., 1994).

La secuencia del *cebador* ER α 1 es 5' AAC ATG ATC ATG GAG TCT GC 3', mientras que el *cebador* ER α 2 tiene una secuencia que es 5' CTT CCA AGT CAT CTC TCT GAC 3', basándonos en White et al., (1987), pero cambiando las bases

correspondientes para conseguir la especificidad de la rata. Estos dos *cebadores* abarcan en el ADNc una longitud de 310 bp y, por tanto, también en el ARNm de la pineal.

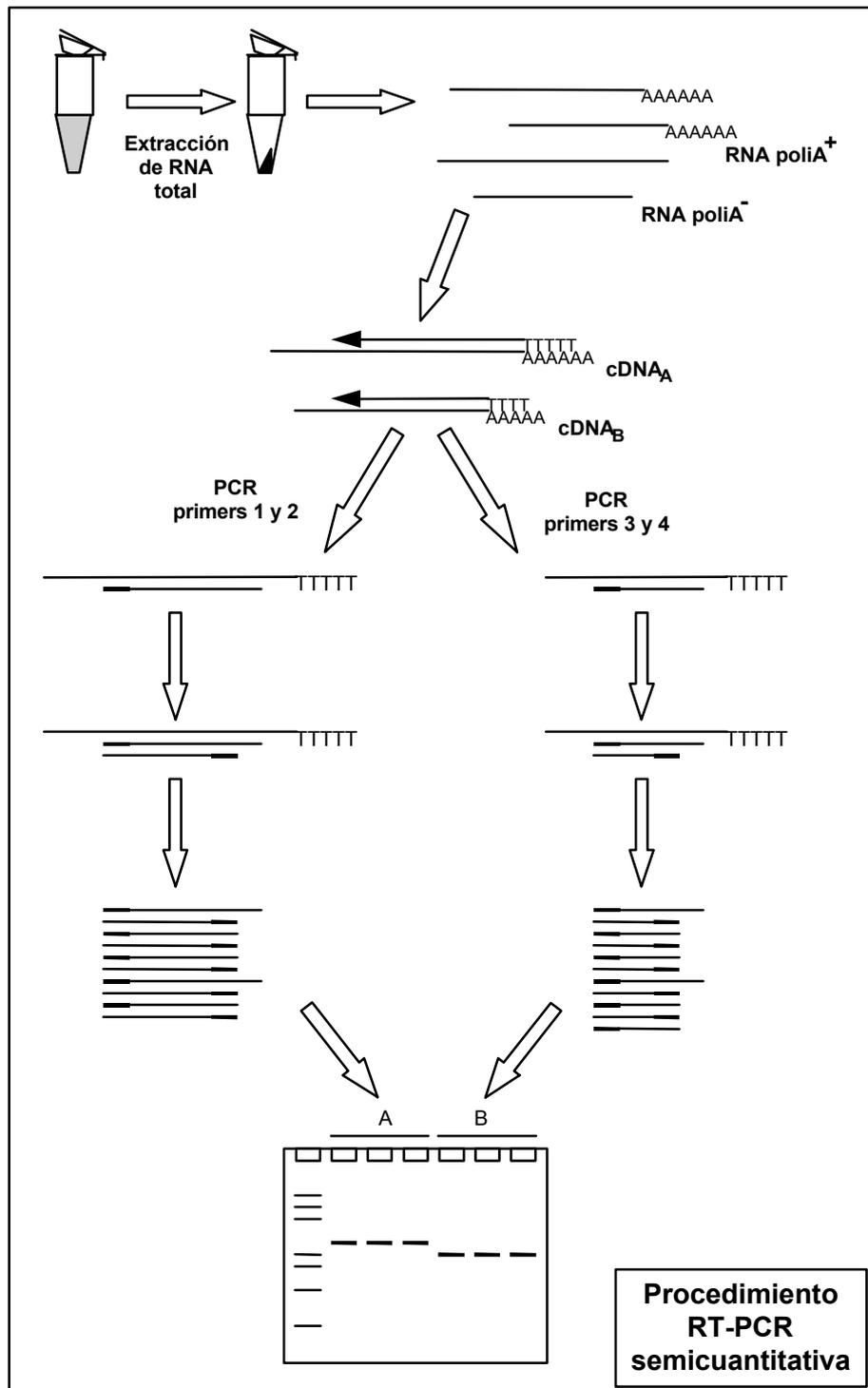


Figura 9: Procedimiento de RT-PCR semicuantitativa para análisis de ARN. Los cebadores (primers) 3 y 4 pueden ser de β -actina para normalizar los valores.

Con respecto a la secuencia del *cebador* ER β 1 es 5' TTC CCG GCA GCA CCA GTA ACC 3', mientras que el *cebador* ER β 2 tiene una secuencia que es 5' TCC CTC TTT GCG TTT GGA CTA 3' (Tremblay et al., 1997). Estos dos *cebadores* abarcan en el ADNc una longitud de 262 bp. En el caso de los *cebadores* diseñados para ambos subtipos de ER, el gran tamaño del fragmento que sería amplificado, 1 kb, hace difícil la amplificación de ADN en vez de ADNc, en las condiciones utilizadas por nosotros.

Los sustratos para la PCR fueron realmente diluciones 1:5 del ADNc: esto evitaba sobresaturar el proceso de amplificación (efecto "plateau") (Gibbs, 1990). La temperatura de "annealing" para ambos subtipos de ER se estableció en 60 °C, que permitía una amplificación consistente y sin presencia de productos inespecíficos. Además, tras varias pruebas previas a distinto número de ciclos en la PCR, se estableció un número de 30 ciclos, que mostró producir una amplificación en condiciones no saturantes. En cuanto a la especificidad del producto amplificado, en cada caso poseía siempre la misma longitud en pares de bases que la secuencias publicadas. Además se procedió a su corte mediante enzimas de restricción; las cuales confirmaron dicha especificidad en todos los casos.

6.5. Visualización de la señal

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 % [según se describe en (Sambrook et al,1989)].

Para hacer visibles las bandas de ADN, el gel se tiñe durante 10 min en una solución de bromuro de etidio (BrEt) (Sigma, WI) a una concentración de 0.5 μ g/ml. Las bandas de ADN de los negativos fotográficos de los geles fueron densitometrados usando un GS-670 Imaging Densitometer (Bio-Rad Labs., CA), asistido por el paquete de software Molecular Analyst[®] (Bio-Rad Labs.).

6.6. Precauciones metodológicas

Un problema habitual cuando se trabaja con técnicas de PCR en general es la contaminación con productos de PCR. Para evitar este riesgo las extracciones de ARN, síntesis de ADNc y la preparación de las PCRs se realizó en una habitación diferente de la utilizada para la electroforesis y análisis posterior de los productos. Además, se efectuaron habitualmente controles negativos donde no se añadió ningún molde de ADN. Los controles dieron siempre resultado negativo, señal de que no existía apreciable contaminación. En general se tomaron las precauciones

generales propias del trabajo con PCR (Kwok et al, 1989). Para eliminar en lo posible variaciones debidas a errores experimentales (pipeteo, etc.), los reactivos de PCR necesarios para todas las muestras de cada experimento fueron preparados como un mezcla única ("master mix") en un volumen grande (incluyendo la Taq ADN polimerasa), a excepción del ADNc. Esto aseguraba la misma concentración de los componentes en todas las reacciones, reduciendo al mínimo las diferencias entre muestras.

7. Análisis de proteínas por "Western Blot"

Con el objeto de determinar la presencia de RE en el pinealocito se identificaron ambos receptores mediante "Western Blot". Esta técnica permite la identificación de proteínas mediante su separación electroforética en geles de acrilamida, y su posterior transferencia a membranas de *nylon* más manejables y finalmente la incubación de éstas en presencia de anticuerpos específicos.

7.1. Recolección de las células

Tras eliminar el medio de cultivo por aspiración, los pinealocitos fueron lavados 2 veces con 1 ml de PBS a 37 °C. Las células se recogieron en 200 µl de buffer de lisis compuesto por un 5% de glicerol, 1% de dodecil sulfato sódico (SDS), 10^{-2} M de β -mercaptoetanol, 6×10^{-2} M de Tris-ClH pH= 7.4 y 10^{-3} M de vanadato sódico. Con la finalidad de eliminar las presencia de proteasas, las muestras se calentaron a 100 °C durante 5 minutos antes de proceder a su análisis.

7.2. Electroforesis

Como paso previo a la identificación de RE presentes en las muestras, se procedió a la separación de las proteínas existentes mediante electroforesis en gel de acrilamida preparado al 8.5%. Para ello 100 µl de muestra se mezclaron con 25 µl de solución de carga, compuesta por Tris-HCl 6×10^{-2} M; 5% de glicerol, 2% de SDS, β -mercaptoetanol 1.44×10^{-2} M y 0.1% de azul de bromofenol. Tras un calentamiento a 100 °C durante 3 minutos, se procedió a cargar en el gel un volumen suficiente de muestra conteniendo 40 µg de proteínas totales. La solución

de electroforesis estuvo compuesta por Tris-HCl 2.5×10^{-2} M, glicina $1,92 \times 10^{-1}$ M y 0.1 % de SDS, con un pH ajustado a 8.3. Se aplicó un voltaje de 140 V con una intensidad de corriente de 40 mA durante 45 minutos (fuente Bio-Rad, mod. 1000/500).

7.3. Transferencia

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas ya separadas y presentes en el gel de acrilamida, se transfirieron a membranas de polivinilo (Hybond-P, PVDF Membranes, Ref. RPN 303F, Amersham), más fáciles de manipular. Con este fin se recurrió a una transferencia eléctrica, consistente en la migración horizontal de las proteínas desde el gel a la membrana. Para ello ambos se dispusieron en íntimo contacto, orientando el gel hacia el polo negativo y la membrana hacia el polo positivo, fijados en un soporte e inmersos en un tanque con una solución de transferencia compuesta por 14.4 g/l de glicina, 3.03 g/l de Trizma-base y metanol al 20%. Se aplicó una corriente de 450 mA y con voltaje de 400 V durante 1 hora (fuente Bio-Rad, mod. 1000/500).

7.4. Incubación con los anticuerpos

Con la finalidad de evitar la fijación inespecífica del anticuerpo a la membrana, dada su alta afinidad por la proteínas, aquella se sometió a una preincubación durante 45 minutos en una solución al 4% de leche Carnation^R (desnatada y rica en proteínas) en un tampón PBS compuesto por Na_3PO_4 8×10^{-2} M, Na_2HPO_4 2×10^{-2} M, NaCl 10^{-1} M, a un pH =7.5. A continuación, las membranas se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos primarios dirigidos contra el receptor correspondiente diluídos a razón de 1:5000 en PBS con un 4% de leche (PBS-C). Para la identificación del $\text{RE}\alpha$ se utilizó un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón (Stress Gen, Biotechnologies Corp., Victoria, BC, Canada; Ref. SRA-1010), mientras que el reconocimiento del $\text{RE}\beta$ se llevó a cabo con un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo (Upstate Biotechnology, New York, U.S.A; Ref. 09-629), (Fig.10).

Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se sometieron a cinco lavados de 15 minutos en PBS con un 0.05% de Tween 20 (PBS-T). A continuación se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y dirigido contra la inmunoglobulina G de ratón (Amersham, Ref. NA931) o de conejo (Amersham, Ref. NA934), en función de la procedencia del anticuerpo primario utilizado. El anticuerpo secundario se diluyó a razón de 1/5000 en PBS-C, siendo el período de incubación de 1 hora. Finalizada ésta, las membranas se lavaron 5 veces durante 15 minutos en PBS-T, procediéndose entonces a su revelado.

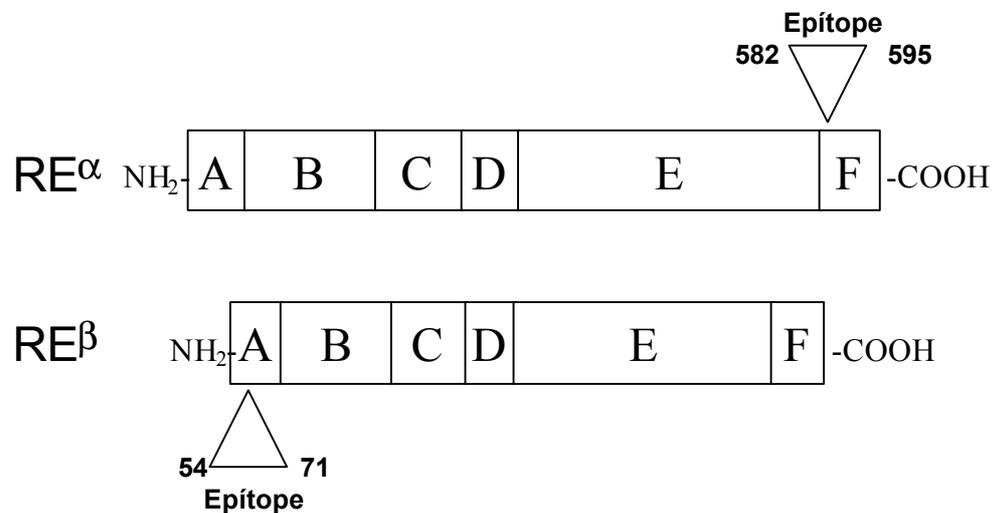


Figura 10. Localización relativa de los aminoácidos utilizados como epítopes para generar los anticuerpos empleados contra los subtipos del RE. Para la identificación del RE^α se utilizó un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón (Stress Gen, Biotechnologies Corp., Victoria, BC, Canada; Ref. SRA-1010), y para RE^β se utilizó el anticuerpo policlonal desarrollado en conejo (Upstate Biotechnology, New York, U.S.A; Ref. 09-629). Los dominios funcionales de cada receptor son: A y B: transactivación, C: dimerización, D: localización nuclear del receptor, E y F: unión a la hormona. (Modificada de Kuiper et al., 1998b).

7.5. Revelado

La detección del RE en las membranas se llevó a cabo mediante una reacción de quimioluminiscencia utilizando para ello un kit comercial (ECL Plus, Amersham, Ref. RPN2132). La técnica está basada en la oxidación de un sustrato denominado Lumigen PS-3 que, en presencia de peróxidos y la peroxidasa unida al

anticuerpo secundario, origina una molécula altamente quimioluminiscente con un máximo de emisión a 430 nm y estable durante 24 horas. Finalizada la reacción de quimioluminiscencia, se procedió a realizar una autoradiografía de las membranas mediante su exposición durante 5 minutos a una película fotográfica (Kodak, X-OMAT, Ref. F-5388, Sigma).

MÉTODOS MORFOLÓGICOS

1. Inmunofluorescencia

Las células fueron lavadas 2 veces en un tampón fosfato salino (PBS), a 37°C durante 5 min. Luego se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 min. Posteriormente, fueron lavadas una vez en PBS 3X y dos veces en PBS 1X. Después de estos lavados, fueron incubadas durante 2 horas en una solución de preincubación: 4% de suero normal de caballo o de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA), en 0,1 M de PBS, pH 7.4, conteniendo 0,01 % de Tritón X-100(TX-100, Sigma). Inmediatamente después se incuban durante 14-18 horas a temperatura ambiente con el o los anticuerpos primarios que corresponda diluidos en PBS con Tritón X-100 al 0,01% y suero normal de caballo o cabra diluido a 1:200. El anticuerpo monoclonal anti-RE α (Stress Gen, Biotechnologies Corp.), se usó a una dilución de 1:250 y para el policlonal anti-RE β (Upstate Biotechnology), a 1:200.

Las células se lavan de nuevo en PBS un mínimo de tres veces durante 10 minutos cada una, antes de colocarlas durante 2 horas en la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con FICT (Jackson Immunoresearch), 1:150 para los primarios hechos en conejo y con estreptavidina-Cy3 (Amersham) a la dilución de 1:1000 para los de ratón. Seguidamente, se realizan tres lavados en PBS y se procede al montaje final con los cubres utilizando como medio de montaje PBS-glicerol al 50%. En las placas control, sin primario o sin secundario no se observó señal positiva. Las imágenes son observadas y fotografiadas en un microscopio Nikon-Labophot-2, equipado con un equipo de epifluorescencia con los filtros adecuados.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo utilizando el programa informático "*Statistix 4.1*" (Analytical Software, Tallahassee, FL, U.S.A). Los resultados fueron analizados de acuerdo con un diseño factorial del tipo 2 x F (fila), donde un factor contenía dos niveles (vehículo o E₂) y el otro factor (F) incluía dos (CON e ISO, CON y PHE o CON y NE). En aquellos casos donde las células se expusieron E₂, el factor referente al tratamiento hormonal incluyó dos niveles (vehículo y E₂). En los casos en que un experimento fue repetido varias veces bajo las mismas condiciones, cada replicación se consideró como un nivel correspondiente a un factor adicional. Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en cada serie de experimentos, los grupos de medias se compararon mediante un ANOVA general (Snedecor y Cochran., 1980), seguido de comparaciones diseñadas previamente. Cuando se encontró una interacción relevante entre los factores principales, el efecto de cada factor fue analizado separadamente para cada nivel de los demás. Cuando fue necesario, se llevaron a cabo análisis de regresión entre dos de las variables medidas y para comparar la homogeneidad de las pendientes se utilizó el análisis de la covarianza, test-F. La constante de disociación (K_D) y el número máximo de sitios de unión (B_{máx.}), fueron calculadas a partir de las representaciones de los experimentos de saturación usando el programa informático *GraphPad Prism* y las significaciones mediante el test de T-Student para muestras no apareadas. En el caso de las variables categóricas se aplicó el test de χ^2 para la determinación de las diferencias significativas. En todos los casos se consideró el valor de p<0.05 como crítico para establecer las diferencias estadísticamente significativas.

Resultados

CARACTERIZACIÓN DE LA ACCIÓN DEL ESTRADIOL

En un principio nos propusimos caracterizar la acción del E₂ descrita previamente en nuestro laboratorio, intentando clarificar los tiempos mínimos de exposición y el rango de concentraciones efectivo. Para ello, como se describe en material y métodos, se seleccionaron los protocolos experimentales adecuados con el fin de optimizar la medición de AMPc e IPs intracelulares. También se abordó la caracterización del efecto del E₂, tratando de identificar si su mecanismo de acción es compatible con la existencia de receptores intracelulares o, alternativamente, con interacciones a nivel de la membrana plasmática. Igualmente, se investigó la esteroespecificidad de los efectos estrogénicos sobre la respuesta del pinealocito a la estimulación adrenérgica.

1. Relación entre la concentración de E₂ y la respuesta del pinealocito a la estimulación adrenérgica

Con el fin de determinar si el efecto del E₂ es dosis dependiente, en un principio se caracterizó esta respuesta en el modelo de pinealocitos dispersos. El efecto de esta hormona fue estudiado para las dos principales señales intracelulares que controlan la bioquímica de la pineal como son, la acumulación de AMPc, que se encuentra principalmente bajo el control de la vía β-adrenérgica, y la acumulación de IPs, fundamentalmente dependiente de la estimulación de receptores α-adrenérgicos.

1.1. Efecto del estradiol sobre la estimulación β-adrenérgica

Para determinar la relación dosis-respuesta del E₂ sobre la producción de AMPc en respuesta a estimulación β-adrenérgica, las células pineales se incubaron en presencia de un amplio rango de concentraciones de E₂ (10⁻¹² M - 10⁻⁷ M), lo que permitió abarcar desde concentraciones inferiores a las fisiológicas hasta rangos muy por encima de los niveles habituales en sangre de esta hormona. Finalizada la exposición al estrógeno, se cuantificaron los niveles de AMPc intracelulares tras la estimulación de los receptores β-adrenérgicos con ISO (10⁻⁶ M).

Tal y como muestra la figura 11A el efecto del E₂ es dependiente de la dosis y parece tener un comportamiento bifásico: en el rango de concentraciones que va desde 10⁻¹¹ M a 10⁻¹⁰ M se observa una inhibición de la respuesta adrenérgica (60 %), mientras que desde 10⁻¹⁰ M a 10⁻⁷ M parece observarse una ligera recuperación de la inhibición.

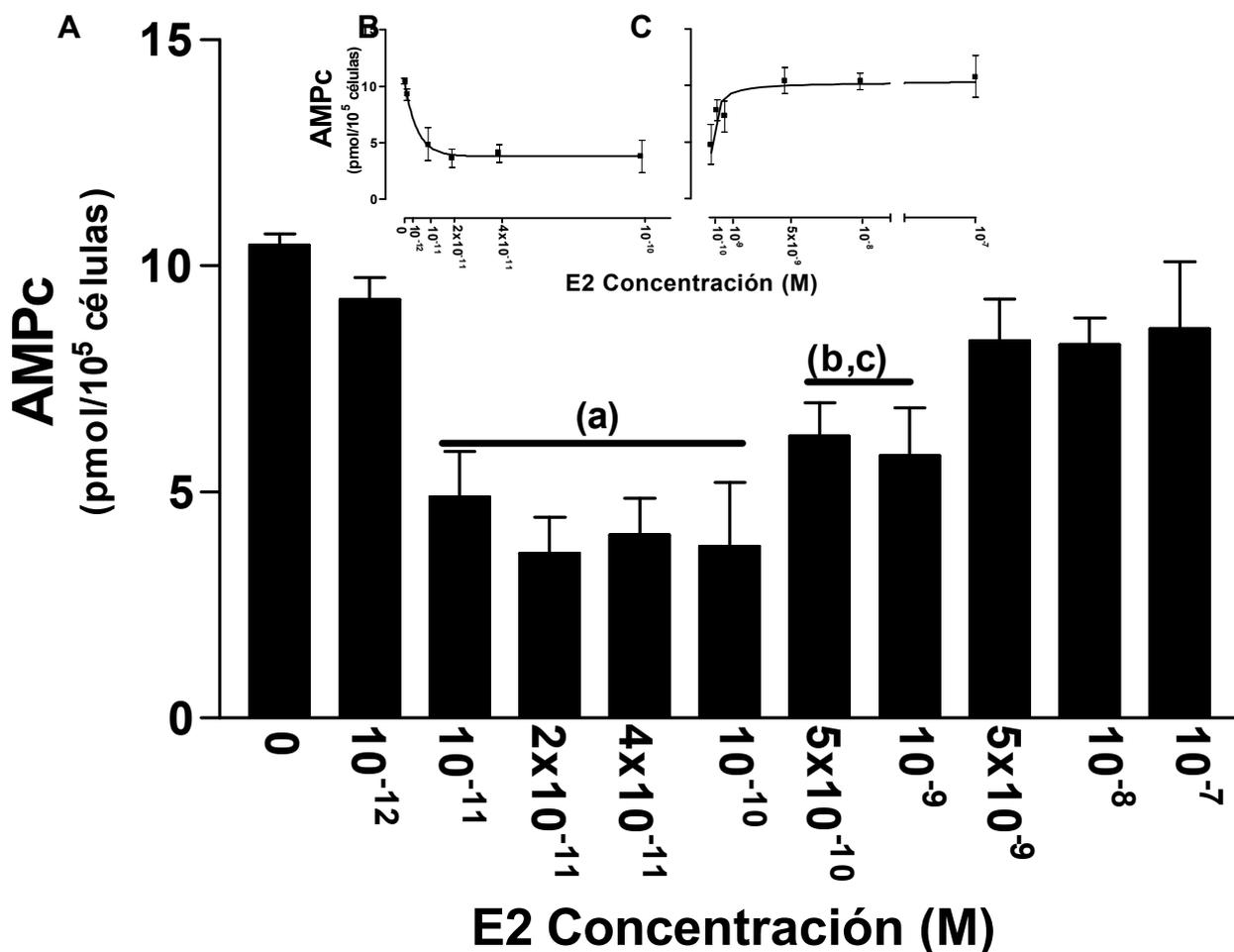


Figura 11: Efecto de la dosis de E₂ sobre la acumulación de AMPc intracelular en respuesta a la estimulación β -adrenérgica con isoproterenol 10⁻⁶ M (ISO). **(A)** Respuesta obtenida en pinealocitos dispersos tras tratamiento hormonal durante 1 hora y estimulación *in vitro*. **(B)** Ajuste a una curva exponencial negativa de los valores de AMPc correspondientes al rango de concentraciones de 0-10⁻¹⁰ M de E₂, $r^2 = 0,98$. **(C)** Ajuste a una hipérbola positiva de los valores correspondientes al rango 10⁻¹⁰-10⁻⁷ M de E₂, $r^2 = 0,86$. Finalizado el período de exposición a la hormona, fueron tratadas con el inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX, 10⁻⁴ M, 60min.), antes de ser estimuladas con ISO para prevenir la degradación enzimática del AMPc. Los datos se representan como la media \pm SEM de 6 placas por grupo (250.000 células/ml cada una).

(a) $P < 0.0001$ vs E₂ (0-10⁻¹² M); (b) $P < 0.05$ vs E₂ (10⁻¹¹-10⁻¹⁰ M); (c) $P < 0.001$ vs E₂ (10⁻¹⁰-10⁻⁷ M).

Este efecto bifásico es perfectamente ajustable a dos curvas con una elevada correlación para ambos intervalos de concentraciones descritos. Si observamos la figura 11 B, que describe el ajuste no lineal hecho para las concentraciones comprendidas en el rango $0-10^{-10}$ M de E_2 , se puede comprobar que la curva que describe el mejor ajuste es una típica exponencial negativa con un valor de $r^2 = 0,98$. Sin embargo, para la última parte de la curva que se encuentra comprendida entre $10^{-10}-10^{-7}$ M de E_2 , el ajuste es el correspondiente a una hipérbola positiva estándar, con un $r^2 = 0,86$ (Fig. 11C). El elevado grado de ajuste nos indica que el efecto dosis dependiente del E_2 puede ser perfectamente descrito como si se tratase de dos curvas independientes, indicando que existen dos componentes en la curva de dosis inicial, lo que podría sugerir la existencia de dos efectos estrogénicos diferentes sobre las células pineales.

1.2. Efecto del estradiol sobre la estimulación α -adrenérgica

Con el fin de determinar si distintas concentraciones de E_2 afectan también de manera significativa a la respuesta α -adrenérgica principal responsable del control de los IPs, se incubaron células pineales con el mismo rango de concentraciones de E_2 que en los experimentos de AMPc (10^{-12} M - 10^{-7} M). Después de 48 horas de iniciado el tratamiento hormonal, se cuantificaron los niveles de IPs totales tras la estimulación de los receptores α -adrenérgicos con PHE (10^{-6} M). Tal y como muestra la figura 12, el E_2 ejerce sobre los niveles de IPs una regulación dosis dependiente que contiene un perfil bifásico similar al visto anteriormente para el AMPc, aunque la magnitud de la inhibición es mucho menor. Las concentraciones más efectivas de inhibición del E_2 utilizadas fueron 2×10^{-11} - 10^{-9} M, llegando a alcanzarse un máximo de 20% de disminución (Fig. 12). Se pudo además comprobar en el caso de los IPs la existencia de una ligera diferencia con respecto a la curva de AMPc, ya que a concentraciones $10^{-8}-10^{-7}$ M de E_2 se alcanzan de nuevo los valores del vehículo, mientras que en el caso de la respuesta β -adrenérgica a estas concentraciones de E_2 aún se observa el efecto inhibitorio, aunque haya disminuido su potencial.

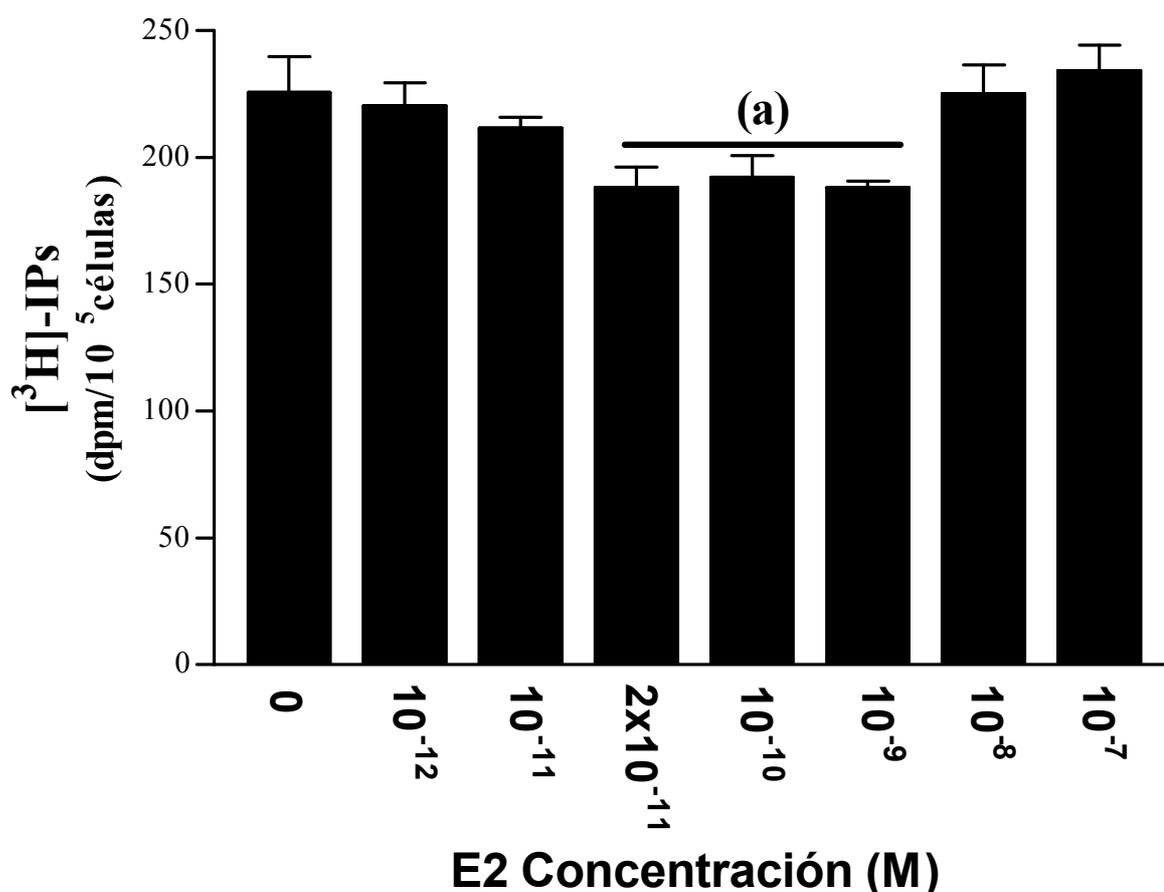


Figura 12: Efecto de la dosis de E₂ sobre la hidrólisis de los IPs inducida por la estimulación α -adrenérgica con fenilefrina 1 μ M (PHE) en pinealocitos dispersos. Células pineales procedentes de ratas OVX fueron incubadas con diferentes concentraciones de estradiol (E₂) o el vehículo correspondiente (0.001% de etanol) durante 48 horas. Doce horas antes de llevar a cabo la estimulación adrenérgica, los pinealocitos se trataron con [³H]-*myo*-inositol (3x10⁻⁶ Ci/placa), tras lo cual fueron incubados con PHE 1 10⁻⁶ M o vehículo (agua, CO) durante 60 minutos. Para prevenir la degradación enzimática de los [³H]-IPs, diez minutos antes de proceder a la estimulación adrenérgica las células se trataron con CLi 10⁻² M, un inhibidor de las fosfatasas. Una vez recolectados los pinealocitos, y tal como se especifica en Material y Métodos, se procedió a la extracción y cuantificación de los [³H]-IPs formados. Se representa la media \pm SEM de 10 placas por grupo (300.000 células/ml cada una). (a) P < 0.05 vs E₂ (0-10⁻¹¹M, y 10⁻⁸-10⁻⁷ M).

De estos resultados podríamos destacar que el efecto del E₂ sobre ambas vías α/β -adrenérgicas es dependiente de su concentración y que presenta un patrón bifásico, con efectos inhibitorios en el rango picomolar y reducción de la capacidad inhibición en el rango nanomolar alto, si bien parece mucho menos acentuado en el caso de la respuesta α -adrenérgica.

2. Curso temporal del efecto del E₂: Tiempo mínimo necesario de exposición a la hormona para observar el efecto

Una vez descrita la relación existente entre la concentración de E₂ y la respuesta pineal, nos propusimos caracterizar temporalmente este efecto. Esto nos posibilitaría una primera aproximación a su mecanismo de acción, diferenciando si se trata de un efecto rápido (previsiblemente no-genómico) o, por el contrario, la hormona necesita unirse a un receptor intracelular clásico para ejercer su efecto y modificar la expresión de determinados genes.

La determinación del tiempo mínimo de incubación con E₂ necesario para observar una disminución en la respuesta adrenérgica se abordó midiendo la acumulación de AMPc intracelular a ISO (10⁻⁶ M), debido a que esta señal es la más importante en el mecanismo de activación de la pineal. Tras las 24 horas de cultivo post-dispersión necesarias para la degeneración de los terminales noradrenérgicos, las células pineales se incubaron en presencia de E₂ (10⁻⁹ M), durante diferentes periodos (5 min. - 48 h.) de tratamiento. Finalizada la exposición al estrógeno, los pinealocitos se estimularon con ISO, siempre a las 48 h. de iniciado el tratamiento hormonal, determinándose los niveles intracelulares de AMPc.

En la figura 13 podemos observar cómo existe una disminución significativa del AMPc en todos los periodos de exposición a la hormona mostrados. Es de destacar que incluso una exposición tan corta a la hormona como pueda ser la de 5 o 15 min., es suficiente para observar el efecto inhibitorio del E₂ sobre el AMPc, siempre que la respuesta a la estimulación adrenérgica sea analizada 48 h después. Este corto periodo de exposición probablemente sea el preciso para que el E₂ difunda a través de la membrana y pueda interactuar con su receptor.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que este efecto descrito del E₂ posee un patrón temporal donde sólo se hace patente la disminución significativa de la respuesta del pinealocito a partir de 48 horas de iniciado este tratamiento hormonal. Aunque la exposición a E₂ solo dure 5 min. han de transcurrir esas 48 h. para poder observar la modulación sobre la función pineal. Es posible, por tanto, que este tiempo corresponda a las modificaciones transcripcionales y postranscripcionales implicadas en dicha modulación.

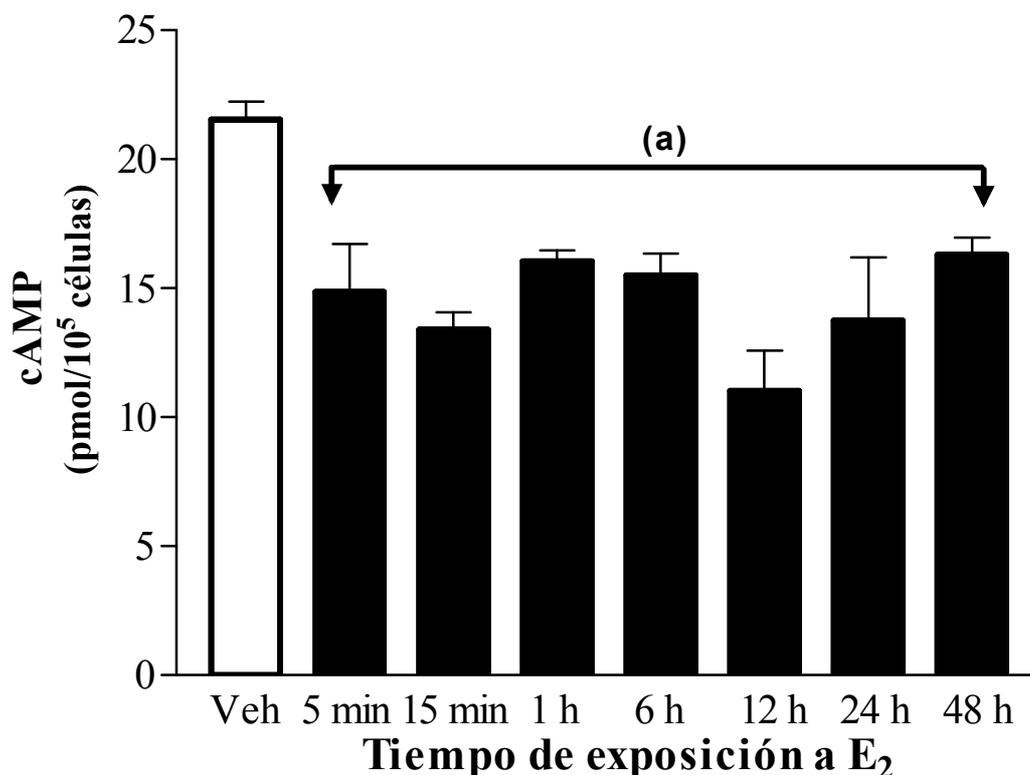


Figura 13: Efecto del tiempo de exposición a estradiol sobre la acumulación de AMPc tras la estimulación β -adrenérgica en pinealocitos dispersos. Las células pineales procedentes de ratas de 20 días OVX, fueron incubadas con 10^{-9} M de estradiol (E₂) o el vehículo correspondiente (Veh, 0.001% de etanol) durante los diferentes periodos especificados en la figura A (desde 5 min. hasta 48 h.). Finalizado el período de exposición a E₂, a diferentes tiempos, las células fueron tratadas con IBMX (10^{-4} M) 1 hora antes de ser estimuladas. Luego se estimularon con isoproterenol 10^{-6} M (ISO, 15 min.) a los tiempos señalados en la figura (0 min. – 48 h.). Los datos se representan como la media \pm SEM de 10 placas por grupo (250.000 células/ml cada una). (a) $P < 0.001$ vs 0 h; (b) $P < 0.05$ vs 0 h.

3. Identificación del lugar de acción del E₂: ¿A nivel de membrana o intracelular?

Para determinar si el efecto del E₂ se ejerce a través de un mecanismo de unión a un receptor de la membrana celular o intracelular, incubamos con el mismo patrón a los pinealocitos con un derivado de E₂ conjugado con albúmina bovina que no cruza la membrana plasmática (E₂-BSA), comparando este efecto con el que resultaba del E₂ libre a dosis equivalentes (10^{-9} M).

3.1. Efecto del E₂ sobre la acumulación de AMPc intracelular

En contraste con la respuesta inhibitoria que ejerce el E₂ sobre la respuesta adrenérgica tras la estimulación con ISO, sólo se observó una muy ligera reducción de los niveles de AMPc cuando tratábamos con E₂-BSA, no siendo nunca dicha disminución estadísticamente significativa (Fig. 14 A)

3.2. Efecto del E₂ sobre la actividad sNAT

Además de estudiar el efecto del E₂-BSA sobre el AMPc, nos propusimos determinar si este conjugado era capaz de regular la actividad sNAT como previamente se había demostrado en nuestro laboratorio para el E₂ libre sobre esta misma enzima. Con este fin cuantificamos la actividad enzimática de la sNAT en pinealocitos incubados con E₂, E₂-BSA o el vehículo, y se procedió a la estimulación adrenérgica durante 6 horas con ISO 1 μ M. Los resultados mostrados en la figura 14 B demuestran que la exposición de los pinealocitos a E₂-BSA (10⁻⁹ M, 1h.), no ejerce una acción significativa sobre la actividad sNAT respecto al vehículo, confirmándose, por el contrario, la inhibición negativa por parte del E₂ libre sobre esta actividad enzimática, ya previamente descrita en nuestro laboratorio.

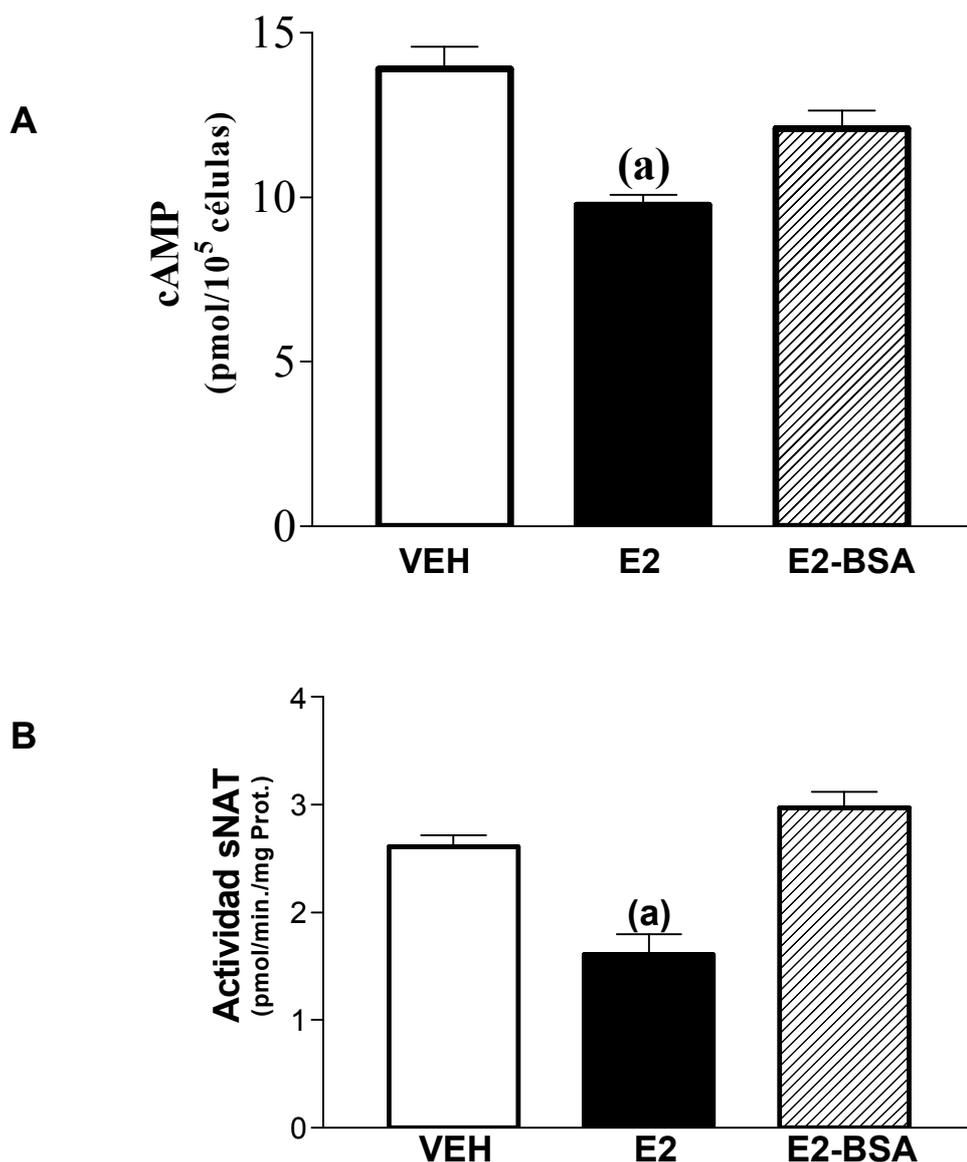


Figura 14: Efecto del E₂ acoplado a BSA sobre la respuesta adrenérgica en pinealocitos dispersos. Acumulación de AMPc intracelular (**A**) y actividad sNAT (**B**), tras la estimulación β-adrenérgica con isoproterenol 10⁻⁶ M (ISO). Las células pineales procedentes de ratas OVX de 21 días fueron expuestas al vehículo (Veh, 0.001% de etanol), o a 10⁻⁹ M de 17β-estradiol, en forma libre o acoplado a BSA, durante 1 hora. Finalizado el período de exposición a la hormona, las células fueron tratadas con IBMX (10⁻⁴ M, 60min.) antes de ser estimuladas con ISO para el caso de la medición del AMPc. Los datos se representan como la media ± SEM de 8 placas por grupo (250.000 células/ml cada una). (a) P < 0.001 vs VEH.

4. Estereoespecificidad del efecto del E₂

Para clarificar la estereoespecificidad de este efecto del E₂ descrito en los apartados anteriores, llevamos a cabo experimentos con el mismo patrón de exposición hormonal en los que se comparó el efecto del 17α-E₂ frente al obtenido

con el $17\beta\text{-E}_2$ a las mismas dosis, midiendo la respuesta del pinealocito a la activación de las distintas vías adrenérgicas.

4.1. Efecto del $17\alpha\text{-E}_2$ sobre la estimulación β -adrenérgica

Para comparar los efectos de ambos estereoisómeros sobre la acumulación de AMPc inducida por estimulación β -adrenérgica, células pineales dispersas fueron incubadas durante 48 horas con $17\alpha\text{-E}_2$ o $17\beta\text{-E}_2$ a la dosis fisiológica de 10^{-9} M. Tras la estimulación durante 15 min. con ISO o ISO+PHE ($1\mu\text{M}$), se determinaron los niveles intracelulares de AMPc.

Como puede apreciarse en la figura 15 A, con respecto al ya descrito efecto del $17\beta\text{-E}_2$, no parece existir diferencia entre los efectos ejercidos por ambos isómeros, ya que ambos inducen una inhibición de la acumulación de AMPc inducida por estimulación β -adrenérgica de magnitud similar.

4.2. Efecto del $17\alpha\text{-E}_2$ sobre la estimulación α -adrenérgica

Para estos experimentos se utilizó el mismo patrón de exposición a E_2 y de estimulación que en el apartado anterior, pero utilizando PHE (10^{-6} M, 1 h.) y determinándose la acumulación intracelular de los IPs totales. Una vez cuantificado este segundo mensajero, se pudo comprobar que también a nivel de la vía α -adrenérgica el $17\alpha\text{-E}_2$ presenta un patrón de inhibición bastante similar al del $17\beta\text{-E}_2$, ejerciendo una regulación significativa de carácter inhibitorio sobre los niveles de IPs totales medidos tras la incubación con Phe (10^{-6} M, 1h.), (Fig. 15 B). Así pues, en principio los efectos descritos anteriormente para ambas vías adrenérgicas no dependerían de la esteroespecificidad del estradiol.

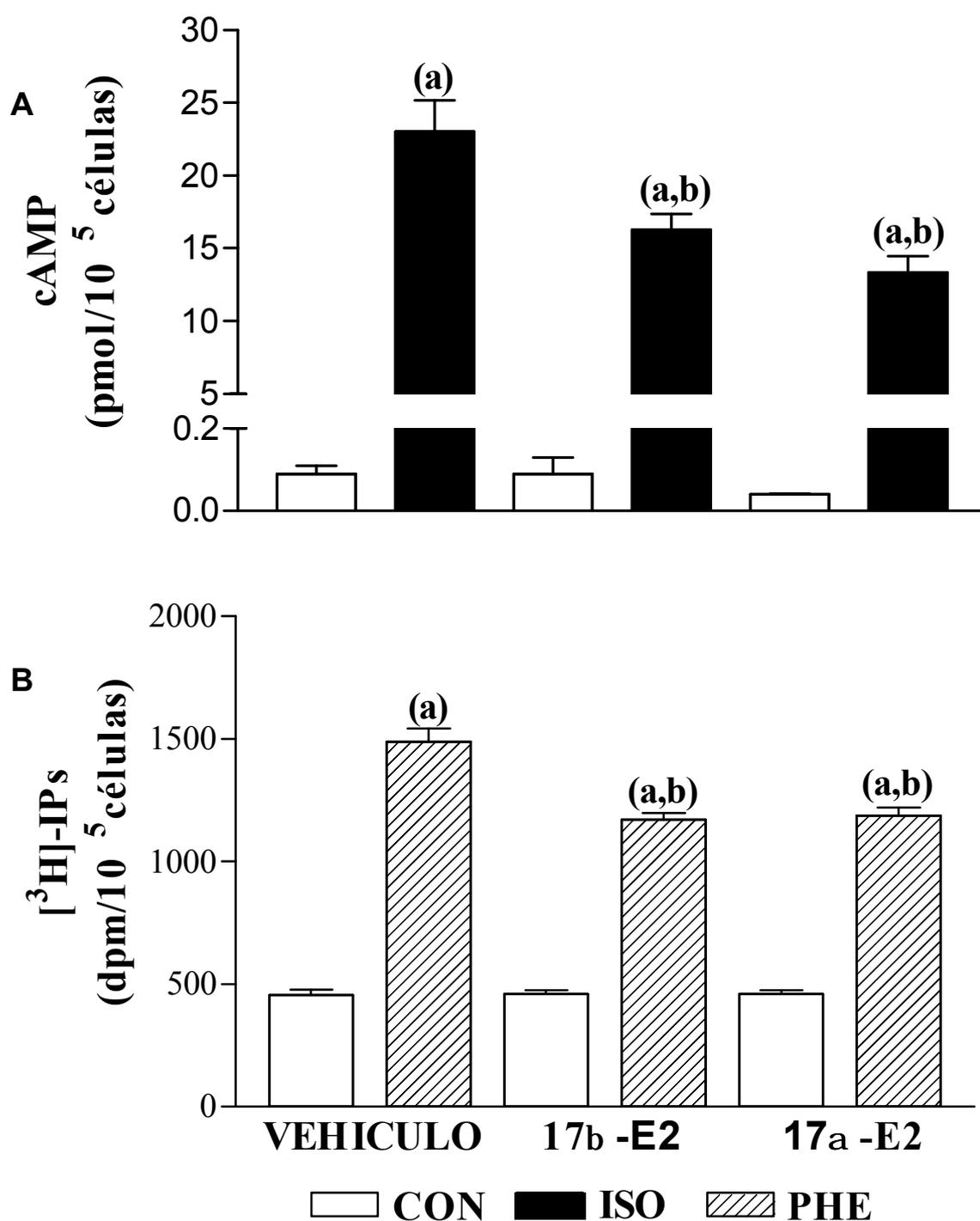


Figura 15: Efecto de los esteroisómeros del estradiol (α y β) la respuesta adrenérgica en pinealocitos dispersos. **(A)** Acumulación de AMPc intracelular tras la estimulación β -adrenérgica con isoproterenol sólo (ISO), o con fenilefrina (ISO+PHE) 10^{-6} M, 15min. para ambos. **(B)** Acumulación de IPs totales inducida por la estimulación α 1-adrenérgica con fenilefrina (10^{-6} M, 1h.). Las células pineales procedentes de ratas OVX de 21 días fueron expuestas al vehículo (Veh, 0.001% de etanol), o a $17\alpha/\beta$ -estradiol (10^{-9} M), durante 48 horas. Los datos se representan como la media \pm SEM de 12 placas por grupo (250000 células/ml cada una). Se observó una diferencia significativa de $p < 0.0001$ para todos los grupos estimulados (ISO e ISO+PHE), con respecto a sus controles basales (CON). (a) $P < 0.0001$ vs CON, (b) $P < 0.01$ vs VEH.

5. Experimentos in vivo

5.1. Dosis-respuesta del E₂ sobre la estimulación β-adrenérgica

Para confirmar los resultados obtenidos con células pineales en cultivo, hemos realizado experimentos con animales enteros, utilizando para ello el modelo experimental descrito en material y métodos. Ratas ovariectomizadas fueron tratadas con estradiol y progesterona in vivo, analizando posteriormente la acumulación de AMPc de la glándula pineal entera en respuesta a NE (10⁻⁶ M) (Fig. 6). El rango de dosis utilizado para el estradiol fue similar al de los experimentos *in vitro* (10⁻¹² - 10⁻⁵ g/rata), lo que permitió abarcar desde concentraciones inferiores a las fisiológicas hasta rangos muy por encima de los niveles habituales en sangre de esta hormona. También se administró una única inyección de Pg (250 μg/rata) 7 horas antes del sacrificio a todos los grupos tratados con E₂, con el objeto de simular el patrón hormonal del animal intacto. A las 48 horas de iniciado el tratamiento hormonal se procedió al sacrificio del animal y a la estimulación de la glándula sin dispersar *in vitro* con NE 10⁻⁶ M durante 10 minutos, tras lo cual se cuantificó la acumulación de AMPc. Por simplificación, hemos limitado el estudio de la curva de dosis de E₂ en el animal entero a la acumulación de AMPc, por ser la señal intracelular más importante en el control de la función pineal y haber obtenido los efectos más claros en los estudios *in vitro*. Tras la estimulación adrenérgica, se pudo comprobar que existía también un comportamiento bifásico, ya que existen dos rangos de dosis con acciones distintas, observándose una inhibición de la acumulación de AMPc cuando administramos dosis de E₂ comprendidas entre 10⁻¹⁰ - 10⁻⁷ g/rata, desapareciendo el efecto inhibitorio con la dosis a 10⁻⁵ g/rata. Es de destacar también que con respecto a las glándulas sin estimular (controles), las distintas dosis de E₂ produjeron una inhibición significativa respecto al vehículo, no observándose un patrón bifásico en este último caso, siendo necesaria la estimulación adrenérgica para poder constatarse una modulación dosis dependiente del E₂ sobre la respuesta pineal (Fig. 16 CON).

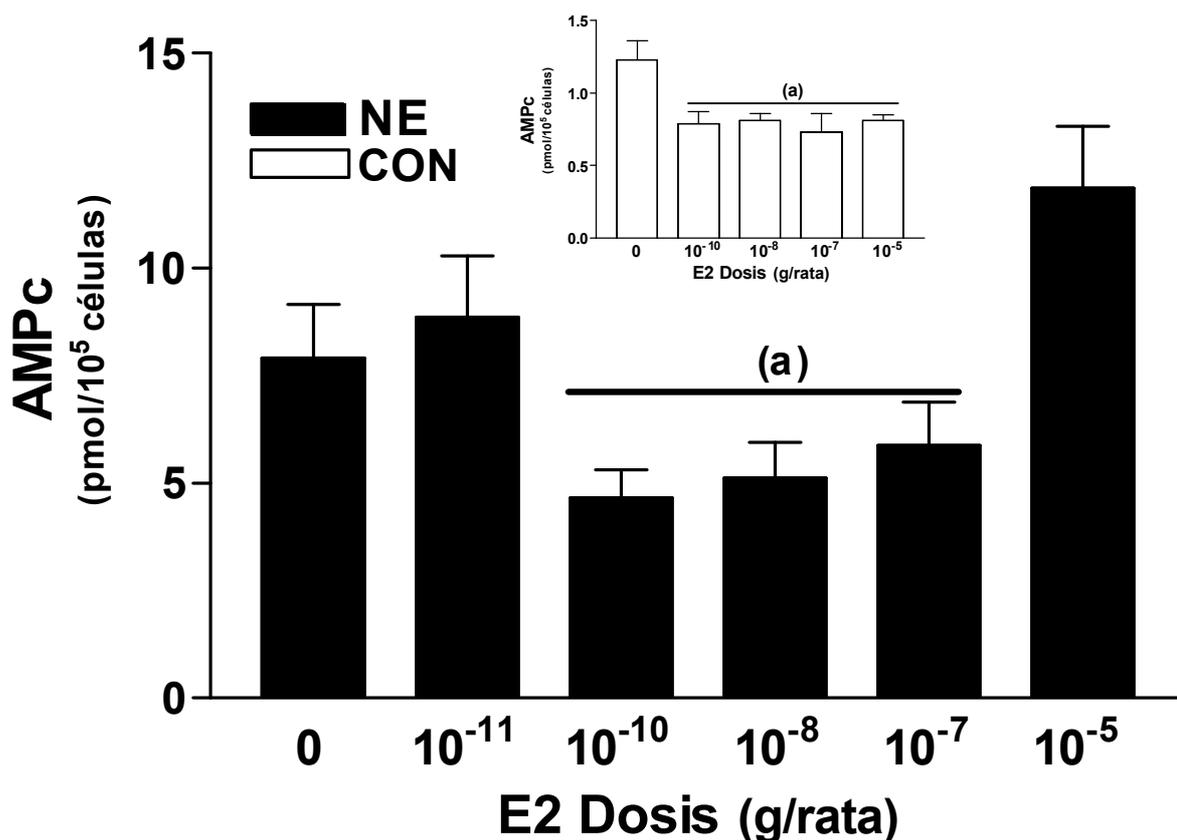


Figura 16: Efecto de la dosis de E_2 sobre la acumulación de AMPc intracelular en respuesta a la estimulación β -adrenérgica con Norepinefrina 10^{-6} M (NE). La respuesta fue obtenida tras tratamiento hormonal in vivo y estimulación de la glándula sin dispersar in vitro. Además a todos los grupos con E_2 se les inyectó una sola dosis de progesterona ($2,5 \times 10^{-4}$ g/rata) siete horas antes del sacrificio. Los controles, barras blancas, representan a las glándulas enteras sin estimular a las cuales se les añadió el vehículo, $10 \mu\text{l}$ de H_2O . Finalizado el período de exposición a la hormona, fueron tratadas con el inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX, 10^{-4} M, 60min.), antes de ser estimuladas con ISO para prevenir la degradación enzimática del AMPc. Los datos se representan como la media \pm SEM de 8-10 pineales enteras por grupo. (a) $P < 0.05$ vs E_2 (0 g/rata).

5.2. Efecto del E_2 sobre la sNAT

En el apartado anterior hemos visto cómo el tratamiento del animal entero con E_2 producía una disminución dosis dependiente de la acumulación de AMPc cuando las glándulas pineales eran estimuladas adrenérgicamente, lo que, previsiblemente, afectaría la actividad del enzima sNAT, paso limitante en la síntesis pineal de melatonina. Con este planteamiento nos propusimos estudiar en el animal entero si el E_2 afecta de manera dosis dependiente un parámetro que caracteriza a la sNAT, como es su velocidad de reacción, la cual se vería reflejado en una modificación de la pendiente en una curva de sustrato. Para ello

seleccionamos a partir de la curva de E_2 hecha en el animal entero donde se medía AMPc, una dosis de E_2 que producía un efecto inhibitorio (10^{-9} g/rata) y otra que había producido un cierto efecto estimulador sobre la acumulación de AMPc inducida por NE (10^{-5} g/rata). El E_2 fue administrado de acuerdo a la misma pauta que los experimentos anteriores en el animal entero, inyectándose también la Pg ($2,5 \times 10^{-4}$ g/rata) 7 horas antes del sacrificio a todos los grupos con E_2 . Finalizada la exposición hormonal se sacrificaron los animales, se disecaron las glándulas pineales individuales y se estimularon durante 6 horas con NE (10^{-6} M) in vitro. Para los análisis de cinética enzimática se seleccionó un rango de concentraciones de sustrato comprendido entre 10^{-4} y 2×10^{-3} M de Triptamina, de forma que en todo momento estuviésemos en condiciones no saturantes para esta enzima.

Los datos mostrados en la fig. 17 nos indican un efecto también bifásico sobre la pendiente de esta curva de sustrato para la sNAT. Cuando estimulamos la glándula con NE (10^{-6} M), se aprecia que la administración de la dosis de 10^{-9} g/rata de E_2 ejerce sobre la pendiente de la curva de triptamina una modulación de carácter inhibitorio ($p < 0.05$ vs VEH), observándose un aumento significativo de la velocidad de reacción de esta enzima ($p < 0.01$ vs VEH) a concentraciones de E_2 . Estos datos corroboran lo visto anteriormente para el AMPc, puesto que el E_2 muestra un efecto dosis dependiente sobre la sNAT. Es de destacar que en este estudio in vivo se puede apreciar el efecto modulador del E_2 sobre la actividad basal de la enzima sin necesidad de estimulación (controles), debido quizás a que dichos valores basales podrían ser fruto de una estimulación parcial como consecuencia de modificaciones estrógeno-dependientes sobre la liberación endógena de norepinefrina.

Además podemos distinguir una ligera diferencia entre los controles y los estimulados en cuanto a la dosis de 10^{-9} g /rata de E_2 , puesto que en el caso de los controles esta dosis no produjo una modulación inhibitoria sino una ligera estimulación de la actividad de la sNAT. Quizás el efecto inhibitorio podría deberse mayoritariamente a los receptores adrenérgicos de membrana que son fundamentales durante la estimulación. Además no se observaron diferencias significativas con respecto a esta actividad sNAT para la dosis mayor de 10^{-5} g/rata

de E₂ cuando éste fue administrado conjuntamente con progesterona (2,5x10⁻⁴g/rata) o solo (datos no mostrados).

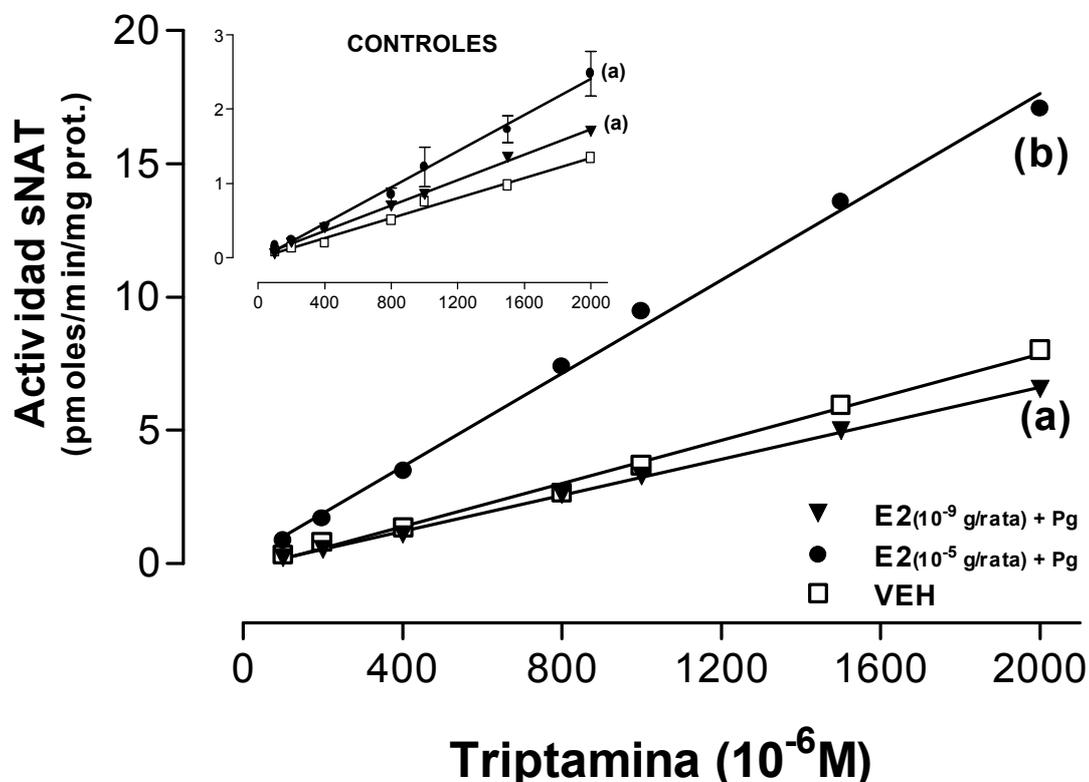


Figura 17: Efecto del E₂ inyectado al animal entero sobre la velocidad de reacción de la sNAT. Ratas hembras OVX fueron inyectadas con 10⁻⁹ g/rata o 10⁻⁵ g/rata de estradiol (E₂) o el vehículo correspondiente (Veh, 0.001% de etanol). También se administró una única inyección de 2,5x10⁻⁶ g/rata de progesterona (Pg), 7 horas antes del sacrificio a todos los grupos con E₂. Transcurrido este periodo a las glándulas pineales enteras se les añadió H₂O (Controles, líneas discontinuas) o norepinefrina 10⁻⁶ M durante 6 horas (líneas continuas) y se cuantificaron las actividades enzimáticas con las diferentes concentraciones de triptamina (10⁻⁴ - 2x10⁻³ M), efectuando el ensayo con las condiciones específicas que se indican en material y métodos. Los datos se representan como la media ± SEM de 6-8 pineales enteras por punto.

(a) p<0.05 vs VEH, (b) p<0.01 vs VEH.

5.3 Efecto del E₂ y de moduladores del RE (SERMs) sobre los principales indoles de la ruta biosintética de la melatonina

Hemos querido ver si la regulación que hace el E₂ sobre la glándula pineal implica una acción directa o indirecta sobre las concentraciones intracelulares de los principales indoles que componen la ruta biosintética de la melatonina: Triptófano, 5-Hidroxitriptófano, 5-Hidroxindolacético (5-HIAA), Serotonina (5-HT) y

N-Acetilserotonina. Una modificación de la concentración intracelular de alguno de estos indoles, afectaría a la melatonina liberada al torrente sanguíneo.

Con este objetivo administramos dosis de 10^{-6} g/rata de E_2 de acuerdo al patrón indicado en material y métodos para el animal entero, inyectándose además una única inyección de Pg ($2,5 \times 10^{-4}$ g/rata) 7 horas antes del sacrificio a todos los grupos con E_2 , con objeto de simular el patrón temporal del animal intacto. Tras las 48 horas de iniciado el tratamiento hormonal en el animal entero, se procedió al sacrificio y estimulación in vitro de las glándulas individuales con NE (10^{-6} M, 6 horas), cuantificándose la concentración de indoles mediante HPLC. Como se puede observar en la figura 18, el tratamiento hormonal redujo el contenido pineal en 5-HIAA y 5-HT en las glándulas no estimuladas con NE,

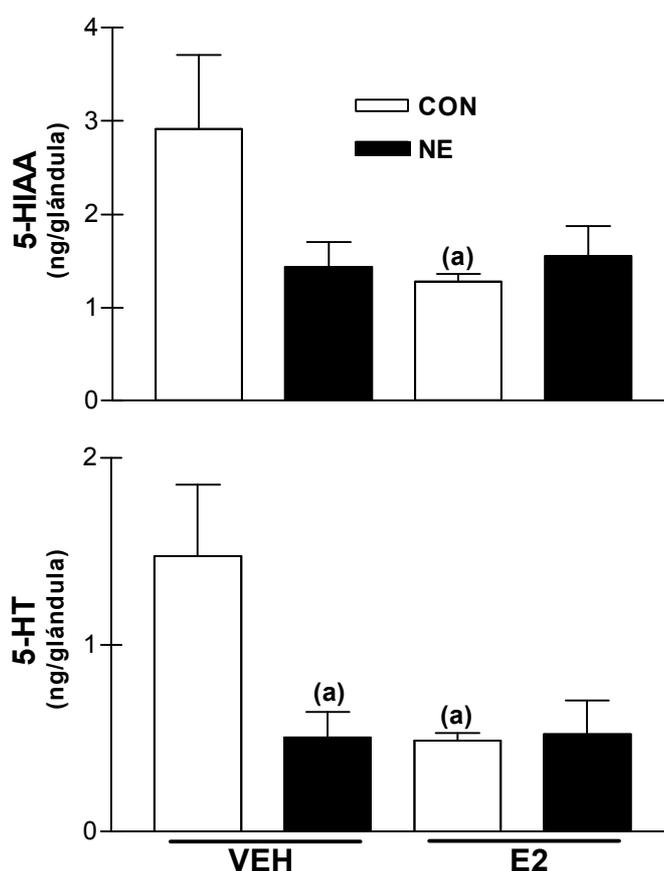


Figura 18 : Efecto del estradiol sobre los principales indoles de la ruta biosintética de la melatonina en respuesta a la estimulación α/β -adrenérgica con norepinefrina 10^{-6} M (NE). La respuesta es obtenida tras tratamiento hormonal in vivo (E_2 10^{-5} g/rata) como se explica en material y métodos, y estimulación de la glándula sin dispersar in vitro. Además a todos lo grupos con E_2 se les inyecto una sola dosis de progesterona ($2,5 \times 10^{-4}$ g/rata) siete horas antes del sacrificio. 5-HT: Serotonina, 5-HIAA: 5-Hidroxindolacético. Los datos se representan como la media \pm SEM de 12 pineales enteras por grupo. (a) $P < 0.05$ vs VEH-CON.

y bloqueó la respuesta a la NE, ya que el contenido en estos indoles no disminuyó tras la estimulación adrenérgica en las glándula procedentes de animales tratados con E₂-Pg. Así, tal como se observa en la figura 18, los niveles de 5-HT y 5-HIAA caen drásticamente al transformarse en el siguiente metabolito de la ruta. Esta disminución en las concentraciones de ambos metabolitos tras la estimulación no se observa en los grupos con el tratamiento hormonal, no existiendo diferencias significativas entre controles y estimulados.

Posteriormente intentamos ver qué efectos tenían sobre estos indoles ciertos “selective estrogen receptor modulators” (SERMs), que son moléculas sintéticas con diferente actividad (agonista o antagonista) sobre los REs y que pueden presentar diferente afinidad por uno u otro subtipo del RE. En este estudio fueron utilizados el Raloxifeno (LY138481-HCl) y el LY117018-HCl, que son compuestos de características no esteroideas de la familia del benzotiofeno, cuyas estructuras químicas se muestran en la figura 19. (McDonnell et al., 1995; Wakeling y Bowler, 1987; Gradishar y V.C, 1997; Grese et al., 1997).

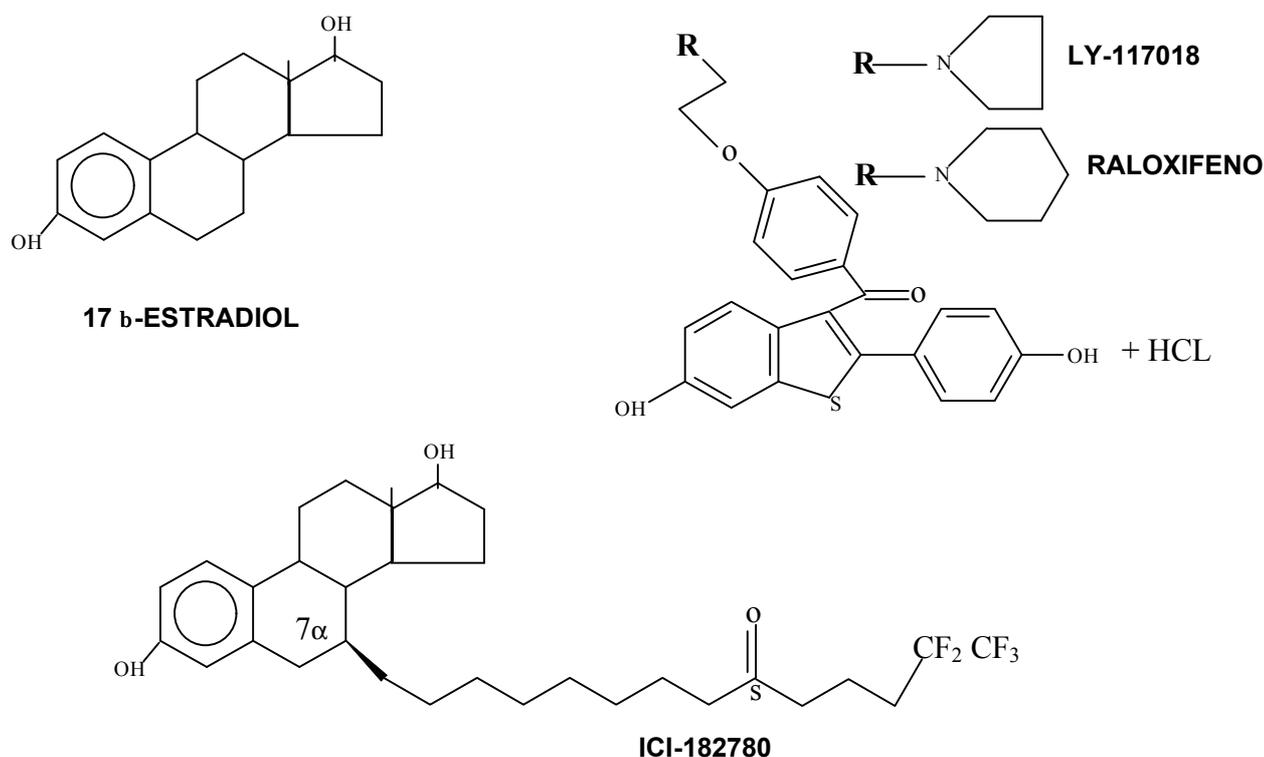


Figura 19: Estructura química de los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM) utilizados en el presente trabajo.

Con el objetivo de posibilitar una adecuada administración y por consiguiente una eficiente respuesta de estas moléculas, se procedió a inyectar estas moléculas SERMs una hora antes de añadir el E₂, luego se les administró el E₂ y transcurridas 48 horas de haber añadido la hormona sexual se procedió al sacrificio y estimulación de las glándulas con el agonista adrenérgico norepinefrina (NE, 10⁻⁶ M, 10min), determinándose las concentraciones intracelulares de sus indoles para cada glándula estimulada.

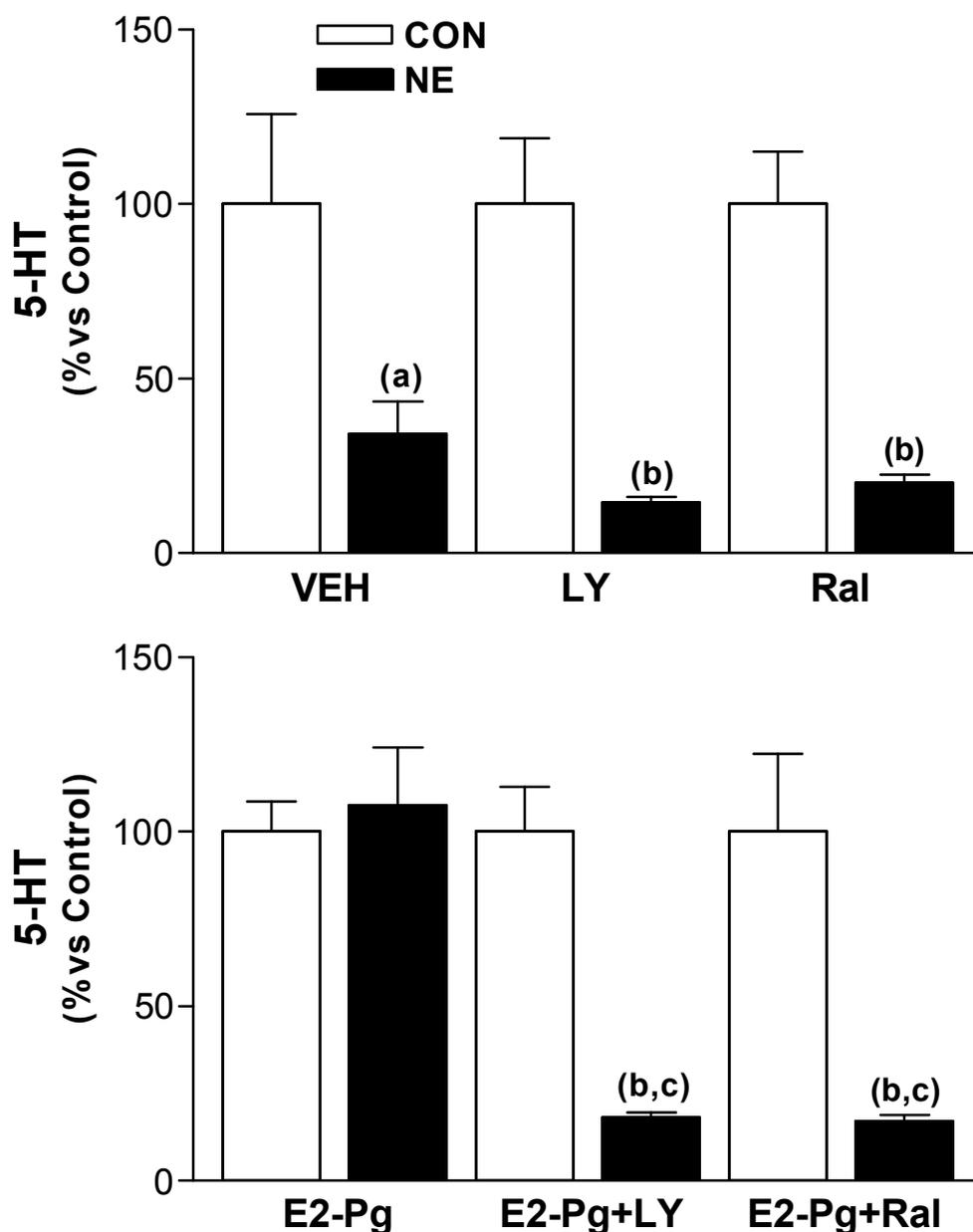


Figura 20: Efecto del LY117018 administrado in vivo sobre acumulación intracelular de Serotonina (5-HT) y el 5-Hidroxy-indol-acético (5-HiAA) tras la estimulación adrenérgica con norepinefrina 10⁻⁶ M, 6h. (NE). Las glándulas pineales procedieron de ratas OVX de 21 días inyectadas con vehículo (Veh, 0.001% de etanol) o con LY117018 (3x10⁻³ g/rata) una hora antes de la inyección del estradiol (10⁻⁵ g/rata). Además a todos lo grupos con E₂ se les inyectó una sola dosis de progesterona (2,5x10⁻⁴ g/rata) siete horas antes del sacrificio,

según el patrón descrito en material y métodos. Los datos se representan como la media \pm SEM de 8-10 pineales enteras por grupo.

(a) $P < 0.05$ vs su control (CON), (b) $P < 0.001$ vs su control y (c) $p < 0.001$ vs E_2 -Pg.

Como se muestra la figura 20, estas moléculas SERMs pueden ejercer por si solas acciones independientemente del E_2 , puesto que tanto el LY-117018-HCl como el Raloxifeno, disminuyen ligeramente, el contenido glandular de la 5-HT cuando se estimulada con NE, al igual que la 5-HIAA que no es mostrada. Pero lo más importante a destacar es que ambas moléculas parecen actuar como antagonistas de la acción del E_2 -Pg, debido a que cuando están presentes las moléculas SERMs a la dosis de 3mg/rata, se revierte ese bloqueo del E_2 -Pg descrito en la Fig. 18 en respuesta a la NE, ya que el contenido en estos indoles disminuye tras la estimulación adrenérgica en las glándula procedentes de animales tratados previamente con los SERMs.

Resulta interesante que este efecto del E_2 y los SERMs sea selectivo sobre estos dos metabolitos y no sobre el resto de los principales indoles involucrados en la ruta biosintética de la melatonina tales como Triptófano, 5-Hidroxitriptófano, y N-Acetilserotonina, ya que estos últimos no presentan diferencias significativas con respecto al vehículo (datos no mostrados).

6. Resumen

El efecto del E_2 sobre la glándula pineal se caracteriza por presentar una regulación compleja dependiente de la dosis a nivel de la respuesta α/β -adrenérgica. Las concentraciones inhibitorias más efectivas de E_2 utilizadas fueron del rango $10^{-11} - 10^{-9}$ M para los cultivos primarios y de 10^{-9} g/rata para los experimentos in vivo. El tiempo mínimo necesario de exposición a la hormona para observar la modulación se encuentra entre 5 y 15 min., siendo necesario un periodo adicional de 48 horas para la observación del efecto. El efecto del E_2 requiere que esta hormona atraviese la membrana plasmática puesto que la modulación no es reproducida por el estradiol acoplado a BSA. El 17α - E_2 ejerció una modulación similar a nivel de la respuesta α/β - adrenérgica. Además, moduladores del RE (SERMs) como el Raloxifeno y el LY-117018, ejercen una

acción antagonista a la del E₂ incluso llegando a ser estimuladora sobre la acumulación intracelular de indoles pineales tales como la 5-HT y 5-HIAA.

IDENTIFICACIÓN DE LA DIANA MEDIADORA DEL EFECTO DEL ESTRADIOL

De los resultados obtenidos hasta el momento se desprende que el E₂ es capaz de regular el metabolismo pineal en la rata hembra, a través de una modulación de la respuesta del pinealocito a la estimulación adrenérgica. El siguiente paso en nuestro trabajo consistió en intentar clarificar el mecanismo por medio del cual esta hormona ejerce su acción sobre esta glándula en su conjunto.

1. Implicación de las proteínas Gs en la regulación adrenérgica del E₂

Hemos intentado localizar la diana intracelular sobre la que se ejercen los efectos del E₂. Para ello nos apoyamos en datos previos de nuestro laboratorio que demostraban que la atenuación de la respuesta β-adrenérgica ejercida por el estradiol no estaba mediada por una modulación directa sobre la AC, ya que la exposición de células pineales a E₂ en concentraciones que redujeron la acumulación de AMPc en respuesta a isoproterenol, no causó ninguna modificación de esta variable en células tratadas con dosis crecientes de forskolina (FK), un activador directo de la AC (Hernández-Díaz, et al. 2001). Estos datos podrían indicar que la diana del E₂ en la inhibición de la respuesta β-adrenérgica estaría localizada en un paso anterior a la AC, lo cual estaría de acuerdo con resultados de otros laboratorios estudiando los efectos del estradiol sobre la respuesta adrenérgica en rodajas de cerebro (Wagner et al., 1979; Etgen y Pettiti, 1986,1987; Harrelson and Mc Ewen, 1987; Ungar et al.,1993).

Con el fin de investigar la posible participación de las proteínas G, utilizamos la exposición de los pinealocitos a la toxina colérica, lo que induce una activación constitutiva de la subunidad estimuladora de aquéllas (Gs α). Para ello utilizamos el cultivo primario de pinealocitos, administrando 10⁻⁹ M de estradiol o el vehículo durante 48 horas, de acuerdo al protocolo de los experimentos previos. Inmediatamente después las células pineales fueron incubadas con CTx (10⁻⁵ g/ml,

30 min.) o su vehículo, y posteriormente con ISO (10^{-5} M) o el vehículo durante 15 min., procesándose las muestras para la cuantificación del AMPc. Como se puede observar en la figura 22, la adición de CTx al medio elevó significativamente los niveles de AMPc, aunque en menor magnitud que el tratamiento con ISO. Sin embargo, la exposición previa a E_2 en dosis que redujo la respuesta al ISO, no afectó a la acumulación de AMPc inducida por CTx. Ello sugiere que el efecto estrogénico no parece afectar los niveles o la capacidad de respuesta de las proteínas G_s , sino que podría implicar modificaciones cualitativas a nivel del acoplamiento entre el receptor β -adrenérgico y las proteínas G, o incluso regular la densidad y/o afinidad de estos receptores de membrana, que en definitiva se traduciría en la inhibición vista de la acumulación de AMPc tras la estimulación adrenérgica.

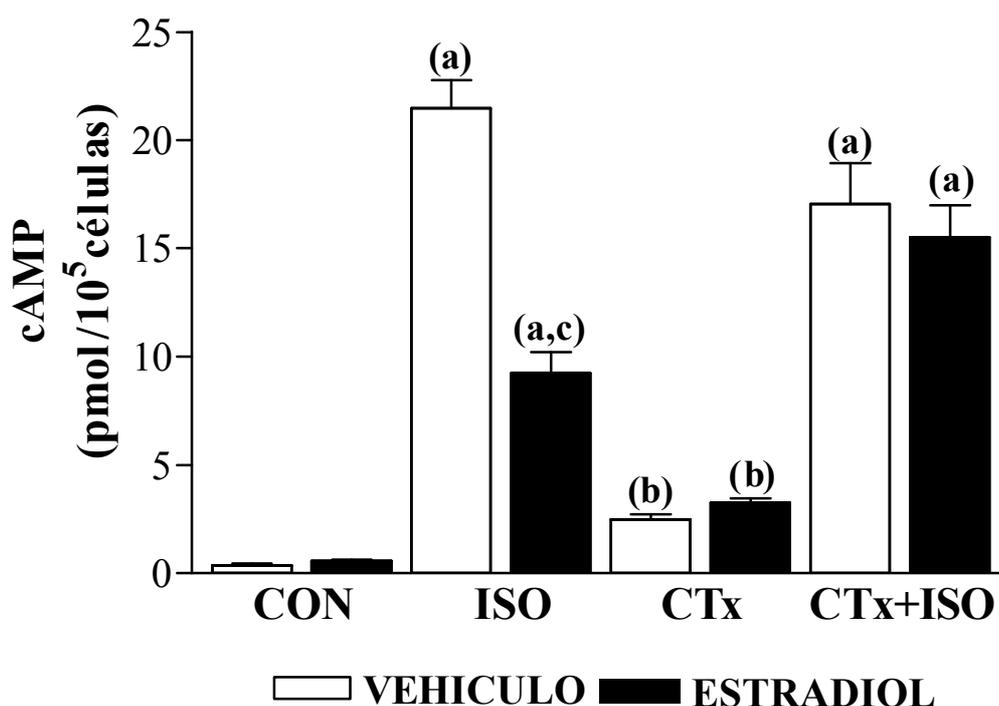


Figura 22: Efecto del estradiol sobre la acumulación de AMPc en pinealocitos tras la estimulación de las proteínas G_s con CTx. Células pineales procedentes de ratas hembra OVX y expuestas a estradiol 10^{-9} M (E_2) durante 48 horas o al vehículo correspondiente (Veh, 0.001% de etanol), se incubaron en presencia de 10^{-5} g/ml de CTx durante 30 minutos, transcurridos los cuales se cuantificaron niveles intracelulares de AMPc por EIA. Para prevenir la degradación enzimática del AMPc las células se incubaron con un inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX, 10^{-4} M) durante los 60 minutos previos a la adición de CTx. Los datos se representan como la media \pm SEM de 10-15 placas por grupo (250.000 células/ml cada una). (a) $p < 0.0001$ vs CON. (b) $p < 0.01$ vs CON. (c) $p < 0.001$ vs Veh.

2. Un tratamiento con FK de células pineales, previo a la exposición a E₂, anula el efecto inhibitorio de la hormona sobre la respuesta b-adrenérgica

Una vez visto que las proteínas Gs no poseen un papel importante dentro del mecanismo por medio del cual el E₂ ejerce su acción, nos planteamos ver si persistía el efecto inhibitorio del E₂ sobre la acumulación de AMPc inducida por estimulación β-adrenérgica, en el caso de activar la AC con FK previamente al tratamiento con E₂. El tratamiento con FK (10⁻⁴ M) se llevó a cabo una hora antes del tratamiento con E₂ (10⁻⁹ M) o el vehículo durante 48 horas, procediéndose entonces a la estimulación de las células pineales con ISO y posterior cuantificación del AMPc acumulado.

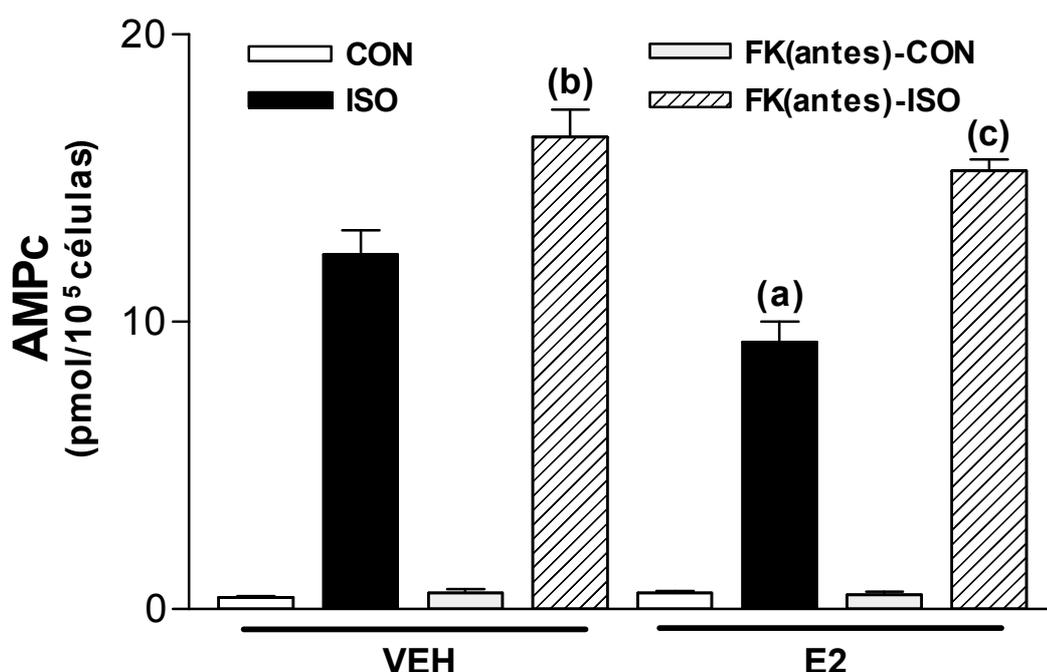


Figura 23: Efecto del tratamiento con FK previo a la exposición a E₂ sobre la acumulación de AMPc en pinealocitos tras la estimulación β1-adrenérgica con Isoproterenol (ISO, 10⁻⁶ M). Células pineales procedentes de ratas hembras OVX fueron expuestas una hora antes del tratamiento hormonal a forskolina (FK, 10⁻⁴ M) o a su vehículo. Seguidamente se procedió a la exposición con estradiol 10⁻⁹ M (E₂) durante 48 horas o al vehículo correspondiente (Veh, 0.001% de etanol), transcurrido este periodo fueron estimuladas con isoproterenol (ISO) durante 15 min., cuantificándose los niveles intracelulares de AMPc por EIA. Para prevenir la degradación enzimática del AMPc las células se incubaron con un inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX, 10⁻⁴ M) durante los 60 minutos previos a la estimulación adrenérgica. Los datos se representan como la media ± SEM de 8-10 placas por grupo (250.000 células/ml cada una). (a) p < 0.01 vs VEH-ISO; (b) p < 0.001 vs VEH-ISO; (c) p < 0.0001 vs E₂-ISO.

Según se observa en la figura 23, el tratamiento con E_2 redujo la respuesta la respuesta de los pinealocitos a la estimulación β -adrenérgica con ISO. Sin embargo, cuando tratamos las células con FK antes del tratamiento hormonal se puede apreciar un incremento significativo en la producción de AMPc, incremento que no es ulteriormente aumentado por el tratamiento con ISO, ni afectado por la exposición a E_2 .

3. Expresión del receptor β_1 -adrenérgico

Los resultados previos son compatibles con la posibilidad de que la regulación ejercida por el E_2 sobre la vía β -adrenérgica sea ejercida a través de una modulación del receptor de membrana que controla esta vía, lo cual, inicialmente, podría deberse a cambios en los niveles de expresión del receptor o en su capacidad funcional, o en ambos. Con objeto de analizar si el E_2 es capaz de modificar la expresión de este receptor hemos utilizado extractos procedentes de pinealocitos sometidos al tratamiento habitual con E_2 o vehículo durante 48 horas, cuantificando el ARNm de este receptor de membrana por la técnica de RT-PCR.

Tras haber extraído el ARN total de estas células, sintetizamos su ADN complementario y se llevó a cabo la amplificación específica del mensajero del receptor β_1 -adrenérgico mediante RT-PCR. Después de la cuantificación de las bandas y normalización con sus respectivas actinas, se pudo comprobar que no existían diferencias significativas en cuanto a la cantidad de ARNm del β_1 -adrenérgico expresado entre las células tratadas con E_2 (2×10^{-11} M, 48h.) y las tratadas con el vehículo (Fig. 24).

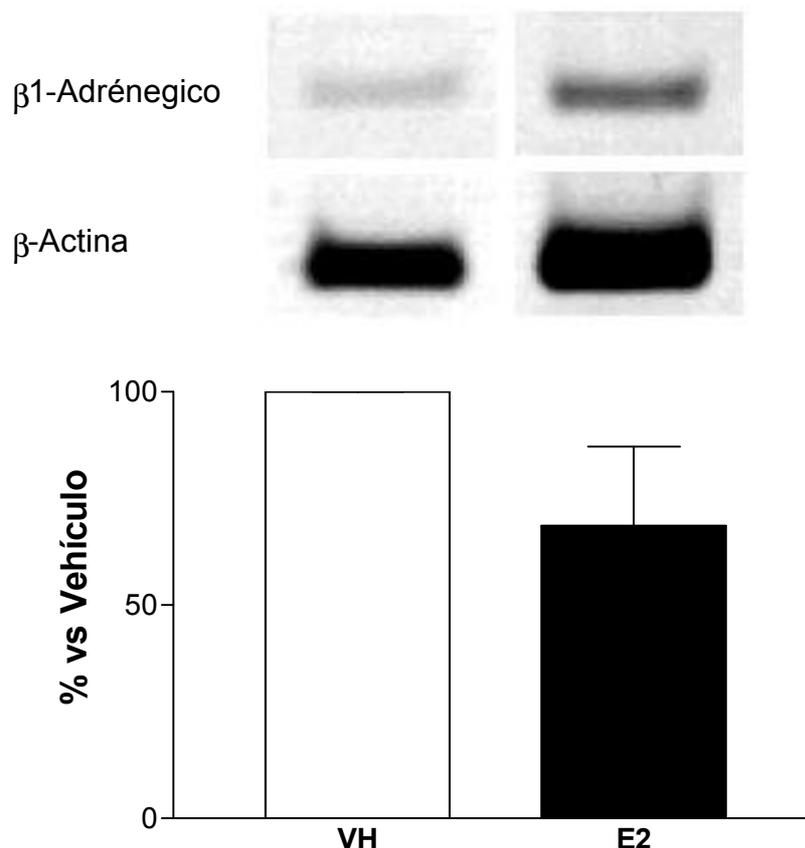


Figura 24: Efecto del E_2 sobre el ARN mensajero del receptor β_1 -adrenérgico en pinealocitos dispersos. Células pineales procedentes de ratas hembras OVX fueron expuestas a 2×10^{-11} M de estradiol (E_2) durante 48 horas o al vehículo correspondiente (Veh, 0.001% de etanol). Transcurrido este periodo fueron cuantificados los niveles de ARNm de este receptor por RT-PCR. Se utilizaron 5×10^{-6} g de ARN para la síntesis de ADNc mediante oligo(dT) como cebador, efectuándose posteriormente 30 ciclos en el proceso de amplificación de la PCR. Todos las muestras fueron normalizadas en base a los valores correspondientes a la amplificación de sus respectivas actinas. Los cebadores y condiciones utilizadas para cada amplificación se especifican en material y métodos. Los datos se representan como % vs vehículo sin tratamiento hormonal de 3 experimentos distintos.

4. Capacidad de ligado del receptor β_1 -adrenérgico

Debido a que en un principio el E_2 no parece modificar la expresión del β_1 -Adrenérgico, ya que no modifica la cantidad de su ARNm en el citoplasma, nos planteamos la posibilidad de que el E_2 pudiese inducir modificaciones cualitativas a nivel de la afinidad de este receptor de membrana por su ligando, que en definitiva se traduciría en una alteración de la respuesta observada (acumulación de AMPc) tras la estimulación con un agonista específico (ISO).

Para abordar este estudio hemos utilizado un mínimo de 3 millones de células por placa, obtenidas tras dispersión de pineales individuales procedentes de rata

hembra ovariectomizada, las cuales han sido incubadas con E_2 (2×10^{-11} M) o vehículo durante 48 horas. Tras homogenización y separación de la fracción de membrana por ultracentrifugación ($100000 \times g$, 1h, $4^\circ C$), se utilizaron muestras de membranas purificadas a una concentración de 5×10^{-5} g/ $100 \mu l$. Posteriormente se procedió a medir la capacidad de unión del β_1 -adrenoceptor or medio de un ligando específico del mismo, el Yodo-Cyanopindolol (ICYP), marcado radiativamente con I^{125} , durante un tiempo de exposición de 30 min. Para caracterizar la unión específica de este ligando al receptor, se hizo competir al ICYP con el propranolol, un antagonista específico de los receptores β_1 -adrenérgicos. El propranolol (5×10^{-5} M) se mostró efectivo en el desplazamiento del ICYP, puesto que al ser añadido al medio de incubación posibilitó un desplazamiento efectivo del ICYP, con la consecuente disminución del producto radiactivo unido a las membranas purificadas (Fig. 25).

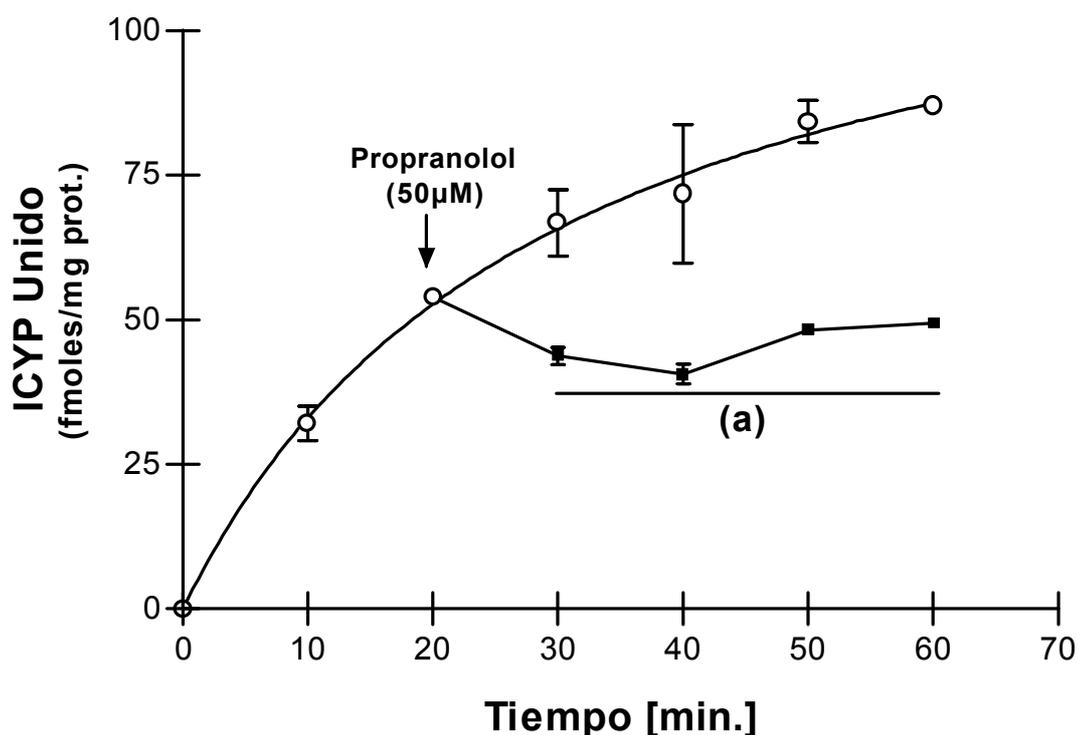


Figura 25: Cinética de asociación y disociación del $[^{125}I]$ -Yodocianopindolol (ICYP) en fracciones de membranas de pinealocitos dispersos. Células pineales procedentes de ratas hembras OVX fueron cultivadas durante 48 horas. Transcurrido este periodo, las membranas purificadas por ultracentrifugación (5×10^{-5} μg) fueron incubadas con 3×10^{-10} M de ICYP a $37^\circ C$ durante 30 min., en presencia o ausencia de 5×10^{-5} M de propranolol. Los datos de unión específica mostrados son de un experimento típico y se representan como la media \pm SEM de 8-10 placas por punto (250.000 células/ml cada una). (a) $p < 0.001$ vs VEH.

Además, ese desplazamiento fue efectivo durante todo el análisis, puesto que se mantuvo incluso 40 minutos después de haber añadido el propranolol. Con esta molécula se hace posible, por lo tanto, discriminar y calcular la unión específica del ICYP radiactivo al receptor β 1-adrenérgico. Esta unión específica del ICYP fue calculada mediante la resta de los valores procedentes del ICYP unido en ausencia del competidor propranolol y los valores en presencia de este antagonista.

Mediante este procedimiento pudimos analizar, seguidamente, el efecto de la exposición a E_2 (2×10^{-11} M) de las células pineales durante 48 horas.

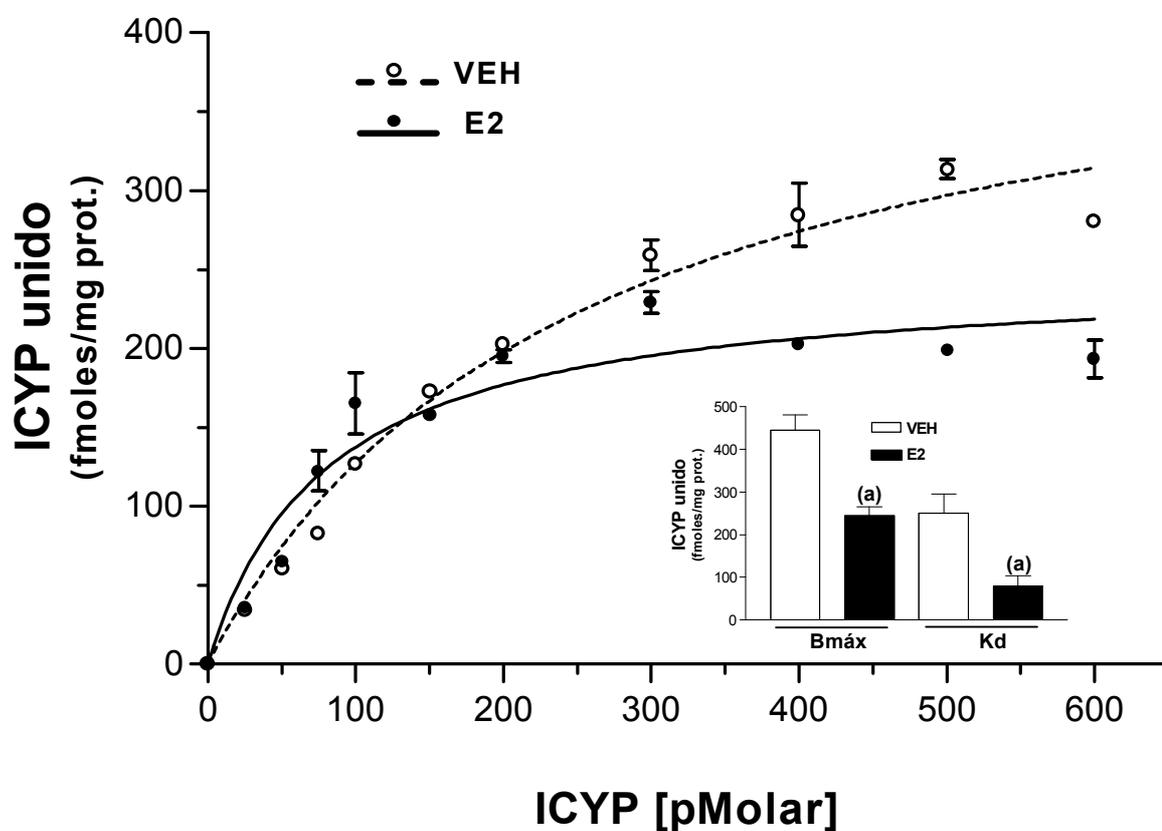


Figura 26: Efecto modulador del E_2 sobre la capacidad de ligando del receptor β 1-adrenérgico en pinealocitos dispersos. Células pineales procedentes de ratas hembras OVX fueron expuestas a 2×10^{-11} M de estradiol (E_2) o al vehículo correspondiente (Veh, 0.001% de etanol) durante 48 horas. Transcurrido este periodo las membranas purificadas por ultracentrifugación (5×10^{-5} g) fueron incubadas con $2,5-80 \times 10^{-11}$ M de $[^{125}I]$ -Yodocianopindolol (ICYP) a 37°C durante 30 min., en presencia o ausencia de 5×10^{-5} M de propranolol, calculándose así las curvas de saturación específicas para el ICYP unido a los receptores β 1-adrenérgicos. Las barras representan los valores de la capacidad máxima de unión (Bmáx.) y la constante de disociación (Kd), calculados a partir de las curvas de saturación específicas representadas con líneas. Los datos se representan como la media \pm SEM de 6-8 placas por punto (250.000 células/ml cada una) de un experimento representativo. N° de experimentos: 4. (a) $p < 0.001$ vs VEH.

Como se observa en la figura 26, las curvas de E₂ y del vehículo presentan un patrón de saturación distinto, siendo menores los valores de saturación de la curva correspondiente a las células pretratadas con E₂. Así, el tratamiento hormonal causó una reducción significativa (30 %) en la B_{máx} que caracteriza este receptor, definida como la máxima capacidad de unión al receptor, lo que podría indicar una disminución del número de receptores β₁-adrenérgicos disponibles en estas membranas para unirse a su ligando.

El efecto inhibitorio del E₂ también se tradujo en una disminución significativa de la constante de disociación del receptor β₁-adrenérgico (K_d), que nos define su afinidad por el ligando ($p < 0.001$). El tratamiento con E₂ indujo una reducción del 40% sobre la K_d de este receptor respecto al vehículo sin tratamiento hormonal (Fig. 26), lo que también apoyaría una menor afinidad del receptor por su ligando, con la consecuente disminución de la respuesta adrenérgica. Por lo tanto, el efecto inhibitorio del E₂ (2×10^{-11} M) visto anteriormente sobre la acumulación de AMPc inducida por estimulación β-adrenérgica (40-70 %), es del mismo orden que el observado para la capacidad de ligado del receptor β₁-adrenérgico.

5. Resumen

El efecto del E₂, de acuerdo a los datos presentados, no tendría como dianas mediadoras ni a la AC ni a las proteínas Gs, puesto que al tratar las células pineales con sus estimuladores directos FK o con CTx no se pudo observar la modulación del E₂ sobre la respuesta adrenérgica. Sin embargo, el efecto inhibitorio del del E₂ sería compatible con una modificación de la capacidad de ligado del receptor de membrana β₁-adrenérgico, aparentemente sin alteraciones en la cantidad de ARNm de este receptor.

IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES INTRACELULARES PARA EL ESTRADIOL EN EL PINEALOCITO

El efecto bifásico del estradiol, así como su posible acción mediada por interacciones con receptores nucleares, debido a las 48 horas necesarias para la observación del mismo y a la necesidad de que la hormona se encuentre en forma

libre (ausencia de efecto por parte del E₂-BSA), es compatible con la existencia de ambos subtipos de receptores estrogénicos (α y β) en las células pineales. Con objeto de comprobar la presencia de la proteína o el ARNm de uno o más subtipos de RE en la glándula pineal, analizamos mediante distintas técnicas extractos procedentes tanto de glándulas enteras como de pinealocitos dispersos sometidos a las mismas condiciones de cultivo descritas en los apartados anteriores.

1. Identificación de subtipos de REs en pinealocitos mediante RT-PCR

Con el propósito de determinar la presencia de los ARNm que codifican uno o más subtipos del RE utilizamos la técnica de la RT-PCR. Esta técnica nos permite amplificar proporcionalmente la cantidad de ARNm específico presente inicialmente en la glándula pineal de cada subtipo de ER, determinándolo así de una forma semicuantitativa. En primer lugar evaluamos si la sensibilidad de la técnica era suficiente para trabajar con glándulas pineales y establecimos las condiciones adecuadas para permitir una amplificación fiable sin presencia de amplificaciones inespecíficas. Como control positivo se analizaron muestras de ovario, tejido donde previamente ha sido detectada la existencia de ambos subtipos del RE (Kuiper et al., 1997b).

Los resultados obtenidos a partir de extractos de pineales enteras y de pinealocitos dispersos se muestran en la fig. 27, confirmándose la presencia de ambos subtipos del RE (α y β), ya que tanto en células dispersas como en glándulas enteras se obtuvo una amplificación constante de ADNc, utilizándose para ello los cebadores específicos de cada subtipo de RE. Estos resultados parecen reflejar adecuadamente la presencia pineal de dos subtipos de ARNm del RE, puesto que no se observaron amplificaciones inespecíficas de ADN genómico. Ello fue debido a que los cebadores usados en cada caso se encontraban situados en diferentes exones, dificultándose así la amplificación de DNA genómico, debido a que daría como resultado un fragmento muy grande (1.5kBp para el DNA, frente a sólo 300-400Bp para el RNA), lográndose así trabajar exclusivamente con ARN.

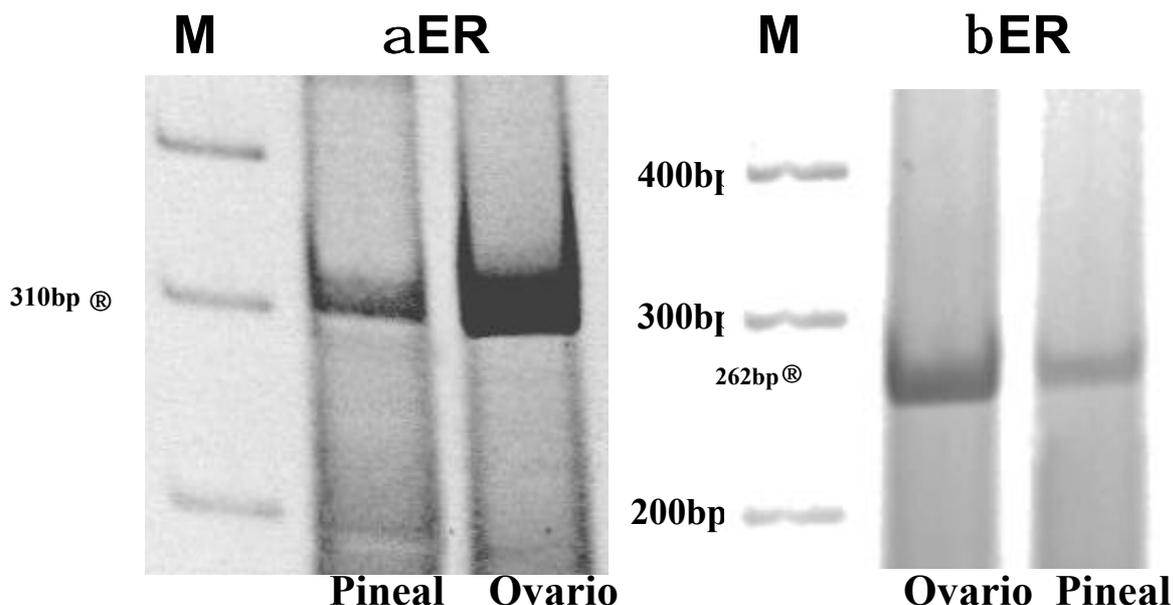


Figura 27: Identificación de los subtipos de receptor de estrógenos (RE) en ovario (control positivo) y en pineal por "RT-PCR". Células pineales procedentes de ratas hembra de 20 días ovariectomizadas se mantuvieron en cultivo durante 72 horas. se utilizaron para la síntesis de ADNc mediante oligo(dT) como cebador se utilizaron 5 μ g de ARN, efectuándose posteriormente 30 ciclos en el proceso de amplificación de la PCR. Para el caso de las pineales se dieron 2 ciclos adicionales y se partió del doble de cantidad de ADNc. M: marcador de tamaño de fragmentos. Las fotos representan geles representativos y los experimentos fueron repetidos 3 veces.

2. Detección de subtipos proteicos del REs en pinealocitos y efecto del estradiol sobre su receptor mediante "Western blot"

Una vez demostrada la existencia de los ARN mensajeros de ambos subtipos del RE, decidimos determinar mediante "Western blot" la presencia de sus respectivas proteínas en extractos procedentes de pinealocitos de ratas hembras OVX mantenidos exactamente en las mismas condiciones de cultivo, pero sin tratamiento hormonal. Simultáneamente se analizaron muestras de útero como control positivo, tejido donde previamente ha sido detectada la existencia de ambos subtipos del RE (Kuiper et al., 1997b). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 28, y revelan la presencia también a nivel proteico, tanto del RE $_{\alpha}$ como del RE $_{\beta}$ en estas células pineales. Los pesos moleculares observados para ambas proteínas coincidieron con los descritos para los dos subtipos del RE en otros tejidos (Tellería et al., 1998; Bhat et al., 1998).

Los datos bibliográficos parecen estar de acuerdo en que la unión del E₂ a su receptor provoca un cambio conformacional y la formación de un dímero, el cual es objeto de una reacción de fosforilación posterior y permite la activación por parte de este RE de la maquinaria transcripcional de la célula. Esto permite que la hormona pueda llegar a sobreexpresar su propio receptor (Prange-Kiel et al., 2001). En nuestro modelo experimental estos datos parecen corroborarse, puesto que el tratamiento de las células pineales con E₂ (10⁻⁹ M, 48h.), indujo un aumento significativo de la proteína correspondiente al RE_α (Fig. 29).

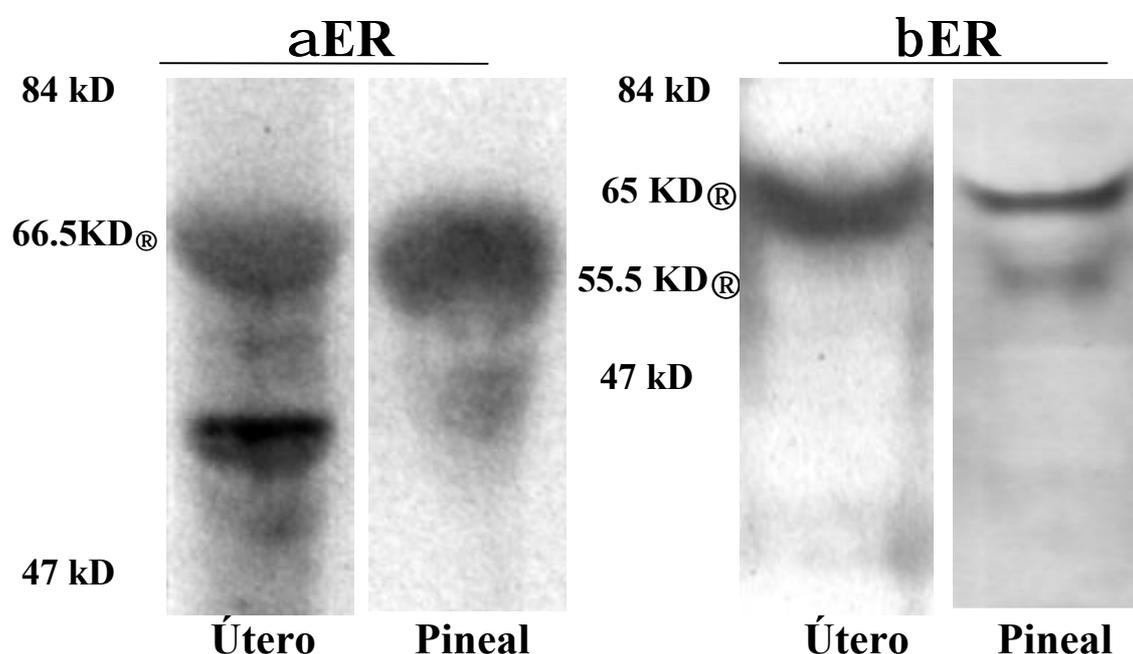


Figura 28: Identificación de los subtipos de receptor de estrógenos (RE) en útero (control positivo) y en células pineales por "Western blot". Células pineales procedentes de ratas hembra de 20 días ovariectomizadas se mantuvieron en cultivo durante 72 horas. Alícuotas conteniendo 40 µg de proteínas fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 11%, que tras una electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La identificación de los dos subtipos de RE se llevó a cabo mediante la incubación de las membranas con un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón contra el RE_α (dilución 1:500, Stressgen Biotechnologies Corp., Victoria, B.C Canada) y un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo dirigido contra el RE_β (dilución 1:500, Upstate Biotechnology, NY, USA). Las fotos representan geles representativos y los experimentos fueron repetidos 4 veces.

Este aumento no fue observado claramente en el caso del ER_β, probablemente debido a que este subtipo del RE se encuentra en mucha menos cantidad en la pineal. Además se realizaron experimentos con distintos anticuerpos

específicos para ambos subtipos del RE con el fin de hacer una verificación más efectiva de los resultados, dando en todos los casos resultados similares. En la figura 29 puede observarse que existen dos bandas de un peso molecular similar para el caso del ER_{α} en vez de una única banda, probablemente debido a que el anticuerpo específico que utilizamos para ver la sobreexpresión del receptor era de carácter policlonal con respecto al monoclonal de la figura 28, que reconocía preferentemente una de ellas. De todos modos la especificidad fue comprobada con controles, tanto negativos como positivos, en ambos casos.

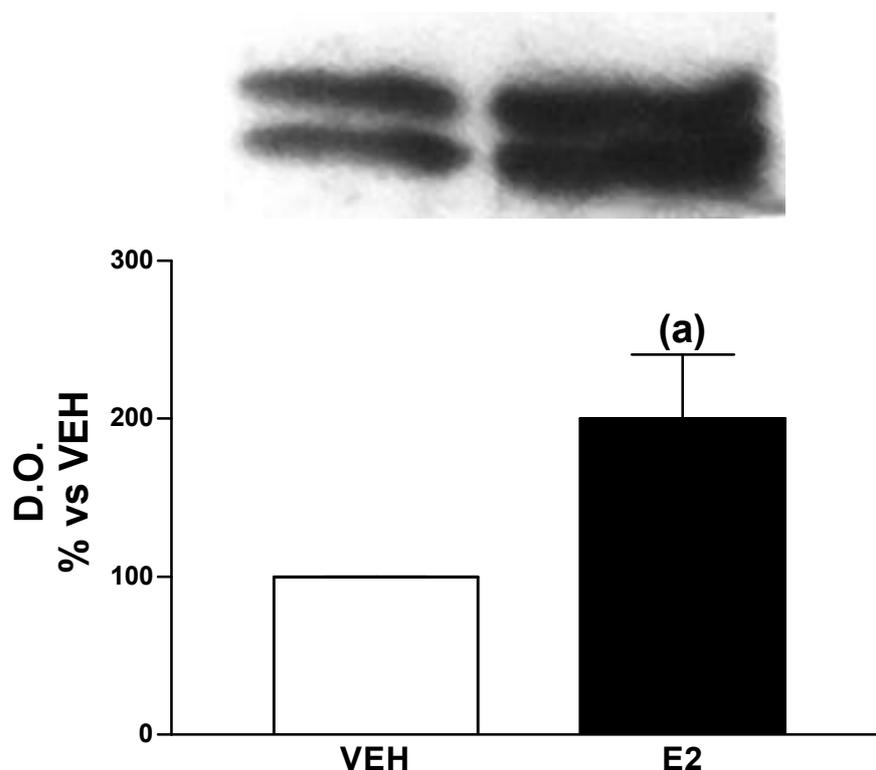


Figura 29: Sobreexpresión del receptor de estrógenos Alpha (ER_{α}) en respuesta al tratamiento con E_2 en células pineales dispersas. Células pineales procedentes de ratas hembra de 20 días ovariectomizadas se mantuvieron en cultivo durante 72 horas y posteriormente se procedió a la detección y cuantificación de esta proteína mediante la técnica del "Western blot". Alícuotas conteniendo 4×10^{-5} g de proteínas fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 11%, que tras una electroforesis fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La identificación del subtipo ER_{α} se llevó a cabo mediante la incubación de las membranas con un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo (1:2500; Sigma, España). Los datos son dados como % con respecto al vehículo sin tratamiento hormonal de 3 experimentos distintos. (a) $p < 0.05$.

3. Identificación y localización de subtipos de REs en pinealocitos mediante Inmunofluorescencia

Con objeto de confirmar la presencia en la glándula pineal de estos subtipos de RE mediante otra técnica de detección de proteínas, utilizamos un método inmunocitoquímica con revelado fluorescente. Esta técnica, además, permite estudiar la localización subcelular de estos receptores y su expresión diferencial según el tipo celular.

En nuestro cultivo primario de pinealocitos se pueden distinguir, en base a su morfología, dos tipos celulares: el pinealocito con forma redondeada (Fig. 30 B), que es predominante, y el de forma estrellada o con prolongaciones (Fig. 30 A, C, D), que se diferencia a partir del anterior, debido a que durante los primeros días de cultivo el pinealocito emite prolongaciones y se asienta sobre la superficie de las placas. Además, en el cultivo puede observarse un escaso número de células del tejido conjuntivo que no han sido objeto de nuestro estudio (célula mayor de la Fig. 30 D), debido a que el cultivo celular sólo se mantenía durante tres días, lo cual no era tiempo suficiente para la proliferación de estos últimos.

Según se muestra en la figura 30, ambos receptores se expresan en las células pineales de la rata hembra, si bien la distribución subcelular es diferente, puesto que el RE α es mucho más abundante y su localización habitual es predominantemente a nivel citoplasmático, llegando a concentrarse en las proximidades de la membrana nuclear y exhibiendo bajos niveles de marcaje dentro del núcleo (Fig. 30 A, B y C). Por su parte, el RE β se expresa en menor cantidad y además presenta una distribución localizada en forma de cúmulos en el interior del núcleo (Fig. 30 A, B y C), observándose menos en el citoplasma, con la excepción de las células del tejido conjuntivo que presentan un mayor marcaje citoplasmático (Fig. 30 D).

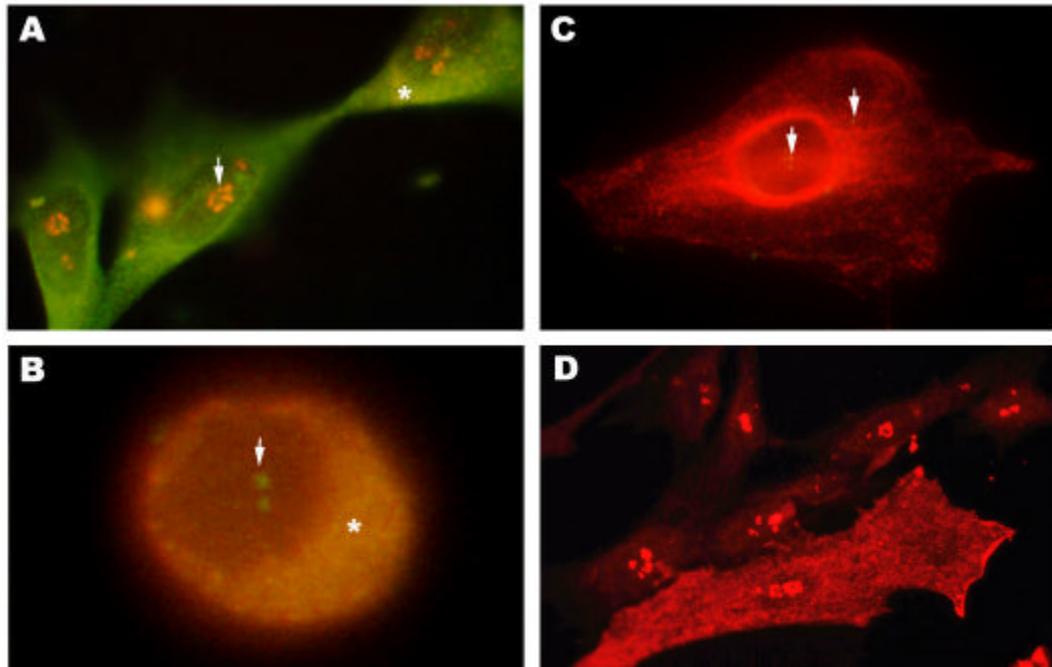


Figura 30: Identificación y localización de los subtipos de receptor de estrógenos en células pineales por inmunofluorescencia. **(A)** Doble marcaje para RE_{α} (verde) y RE_{β} (rojo, flecha). **(B)** y **(C)** Doble marcaje para ER_{α} (rojo) y ER_{β} (verde, flecha). Cuando se mezclan ambas señales el color resultante es anaranjado (asterisco). **(D)** Marcaje simple para ER_{β} (rojo). Células pineales procedentes de ratas hembras de 20 días ovariectomizadas se mantuvieron en cultivo durante 72 horas fijándose posteriormente con paraformaldehído al 4%. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- RE_{α} (Stress Gen, Biotechnologies Corp., dilución 1:250) y uno policlonal anti- RE_{β} (Upstate Biotechnology, dilución 1:200). Posteriormente se incubaron las células con anticuerpos secundarios conjugados con FICT (Jackson Inmunoresearch, 1:150) o con Cy2 (Amersham, 1:1000) para los primarios hechos en conejo y con estreptavidina-Cy3 (Amersham, 1:1000) para los de ratón. En las placas control, sin primario o sin secundario, no se observó señal positiva. Las fotografías son representativas de 4 experimentos distintos.

4. Dinámica del receptor

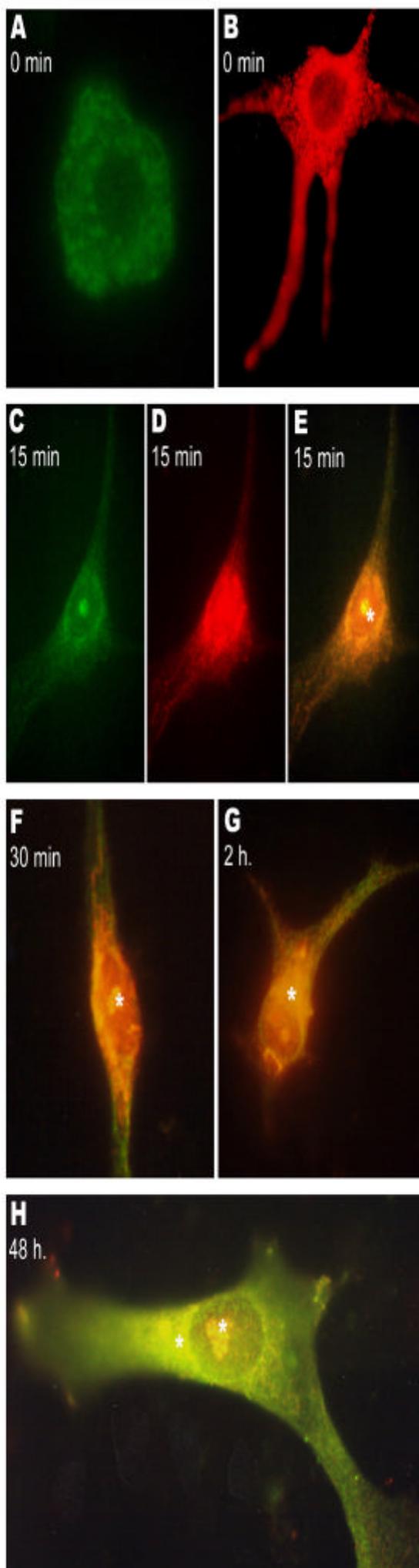
4.1. *Translocación del RE*

Una vez demostrado que ambos subtipos del RE se expresan en estas células pineales, la siguiente cuestión que nos planteamos fue comprobar si esos receptores eran o no capaces de translocarse hacia el núcleo en presencia de estradiol, lo cual

indicaría que estarían capacitados para desarrollar su función específica como factor de transcripción en la modulación de una expresión génica determinada. Para ello se procedió a incubar células pineales durante diferentes periodos temporales que iban desde 0 min. hasta 48 horas con 2×10^{-11} M de E_2 o el vehículo, interrumpiéndose el tráfico intracelular de estos receptores mediante la fijación con paraformaldehído de las células a tiempos sucesivos de iniciado el tratamiento.

Como se puede apreciar en las microfotografías de inmunofluorescencia (Fig. 31), en células que no han sido tratadas con E_2 (0 min. de tiempo de exposición a E_2), ambos subtipos del RE se encuentran mayoritariamente en el citoplasma, siendo a los 15 minutos de la exposición al E_2 cuando la localización de ambos subtipos pasa a ser casi exclusivamente nuclear, permaneciendo en este compartimento a los 30 min. (Fig. 31 A-F). A partir de los 30 minutos de exposición a E_2 es cuando empiezan de nuevo a moverse hacia el citoplasma, perdiéndose paulatinamente la señal del núcleo a favor de la señal citoplasmática, aunque en el caso del $ER\beta$ se conserva parte de su localización nuclear (Fig. 31 F, G y H). Tras largos tiempos de exposición a E_2 existen movimientos de ambos subtipos del RE, observándose en torno a las 48 horas una localización diferente para ambos, puesto que el $ER\beta$ se sitúa en gránulos intranucleares y perinucleares, mientras que el $ER\alpha$ lo hace más bien en el espacio citoplasmático (Fig. 31 H). Que ambos receptores sean dinámicos y puedan translocarse en el pinealocito de manera diferenciada, posibilita que se puedan dar acciones moduladoras diferentes sobre la función pineal a través de interacciones del ligando endógeno con uno u otro subtipo del RE.

Figura 31: Efecto de la administración de E_2 sobre la localización subcelular de ambos subtipos del RE (α y β) en células pineales por inmunofluorescencia. Células pineales procedentes de ratas de 20 días OVX fueron expuestas a 2×10^{-11} M de estradiol (E_2) o al vehículo correspondiente. Posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % a los tiempos correspondientes. Los tiempos indicados corresponden al tiempo transcurrido desde que se añadió el E_2 al medio de cultivo. **A** y **C** corresponden a la señal del $ER\beta$ (FICT, verde), mientras que **B** y **D** muestran la señal del $ER\alpha$ (estreptavidina-Cy3, rojo). Cuando se mezclan ambas señales el color resultante es el amarillo (asterisco en **E**, **F**, **G** y **H**). En el caso de la fotografía **H**, se intercambiaron los marcajes para demostrar la especificidad de los secundarios, $ER\alpha$ en verde y el $ER\beta$ en rojo. Para el $ER\alpha$ se utilizó un anticuerpo monoclonal (Stress Gen, Biotechnologies Corp., dilución 1:250) y un policlonal para el $ER\beta$ (Upstate Biotechnology, dilución 1:200). Las fotografías son representativas de 2 experimentos distintos. 



4.2. Efecto del antiestrógeno ICI182780 sobre la traslocación del RE

Una vez comprobado que los receptores de estrógeno incrementan considerablemente su movimiento entre los compartimentos núcleo-citoplasma al añadir el E₂ al medio de cultivo, hemos estudiado la modificación de ese patrón de translocación mediante un antagonista “puro” del receptor estrogénico, como es el ICI182780 (ICI). Este compuesto, como se muestra en la figura 19, tiene una estructura esteroidea y posee la capacidad de unirse competitivamente al RE, modificar su conformación e impedir su translocación núcleo-citoplasma, atribuyéndosele un efecto inactivador sobre el RE (Dauvois et al., 1993). En todos los experimentos se añadió una hora antes la molécula ICI o su correspondiente vehículo al medio de cultivo y posteriormente las células fueron incubadas con E₂ 2 x 10⁻¹¹ M o su vehículo, interrumpiéndose la actividad celular a los tiempos correspondientes mediante fijación con paraformaldehído al 4 %.

Los marcajes obtenidos tras la adición de ICI y posterior tratamiento con E₂ a distintos tiempos son mostrados en la figura 32. Se pudo comprobar que al exponer las células pineales al ICI durante una hora sin añadirle el E₂, es decir, a los 0 minutos de tratamiento con E₂, la señal basal de ambos subtipos del RE disminuyó drásticamente con respecto al mismo periodo temporal observado previamente (comparar Fig. 31 con Fig. 32, microfotografías A y B). Además, en presencia de ICI el marcaje de ambos RE se hace mucho más difuso perdiéndose prácticamente la señal del núcleo (Fig. 32, A-D).

Si comparamos el resto de los periodos temporales expuestos en las figuras 31 y 32, que corresponden a la adición de E₂ solo e ICI+E₂ respectivamente, se comprueba cómo el ICI bloquea el efecto de acumulación de los receptores en el interior nuclear a los 15 min. de la adición de E₂ al medio de cultivo. Con la presencia previa del ICI se imposibilita el movimiento dinámico de los RE descrito en el apartado anterior, perdiéndose prácticamente la señal positiva en el núcleo. Por otra parte, se apreció también una fuerte reducción en la intensidad de la señal de ambos subtipos del RE cuando los pinealocitos fueron pretratados con ICI una hora antes de la adición del E₂. Esta pérdida de señal del RE corrobora los datos previamente descritos en células Cos-1,

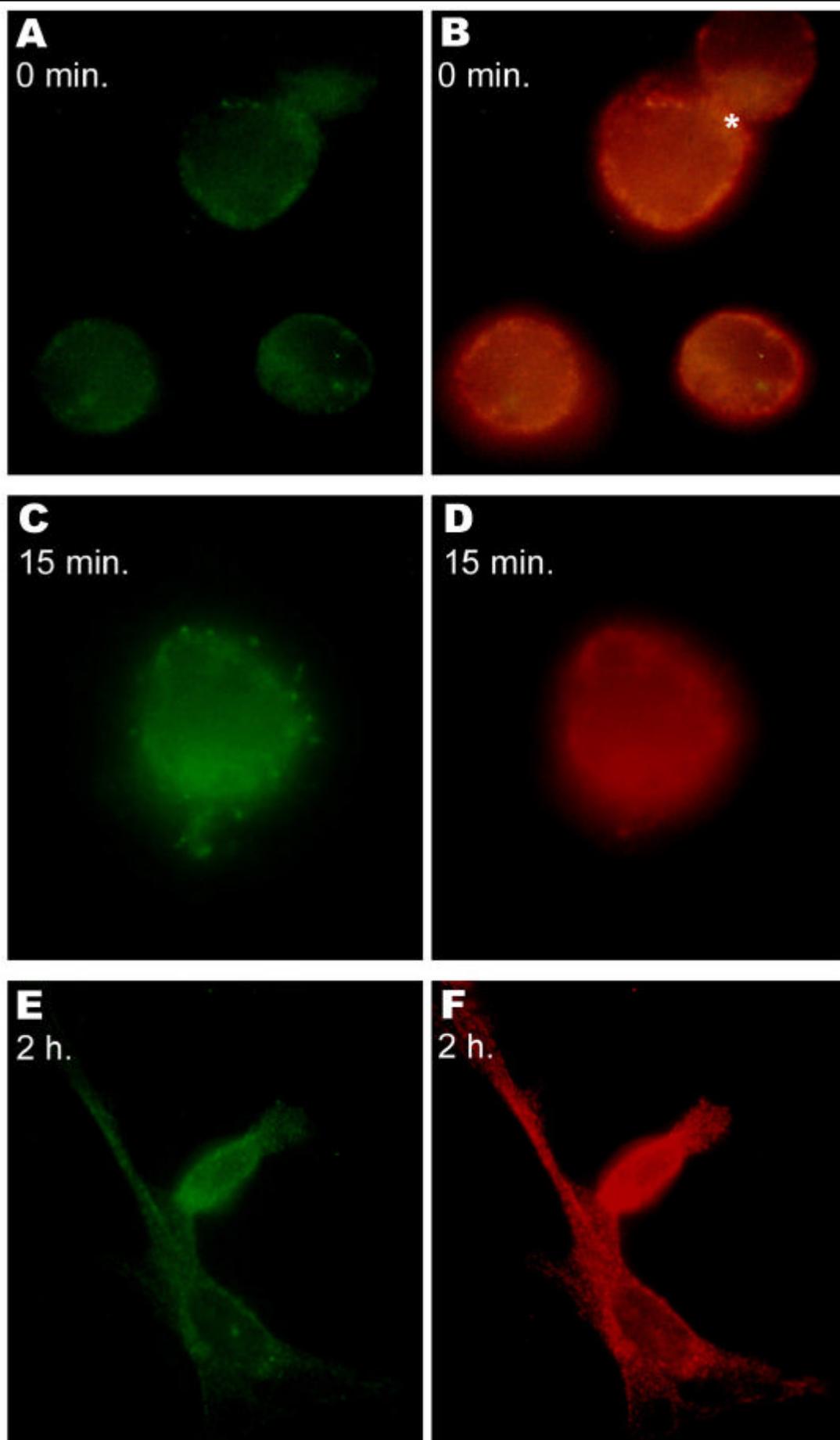


Figura 32: Efecto de la administración del ICI 182780 sobre la intensidad del marcaje y localización subcelular de ambos subtipos del RE (α y β) en células pineales por inmunofluorescencia. Células pineales procedentes de ratas de 20 días OVX fueron expuestas a 2×10^{-11} M de estradiol (E_2) o al vehículo correspondiente. Posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % a los tiempos indicados. Una hora antes de la adición del E_2 se añadió el ICI 182780 (10^{-7} M), con el fin de prevenir el efecto del E_2 . Los tiempos indicados corresponden al tiempo transcurrido desde que se le añadió el E_2 . Las fotografías **A**, **C** y **E** corresponden al marcaje simple del RE_β (verde). La fotografía **B** corresponde a un doble marcaje, dando un color amarillo al mezclarse ambas señales (asterísco). Las fotografías **D** y **F** corresponden al RE_α (rojo). Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- RE_α (Stress Gen, Biotechnologies Corp., dilución 1:250) y un policlonal anti- RE_β (Upstate Biotechnology, dilución 1:200). Las fotografías son representativas de 2 experimentos distintos.

donde se ha sugerido que esta pérdida de señal se debe a que el ICI afecta los niveles de la forma estable del RE al reducir la vida media de esta proteína (Dauvois y col., 1992).

5. Resumen

Mediantes técnicas complementarias, hemos comprobado que ambos subtipos del RE (α y β) se expresan de manera abundante en la glándula pineal de la rata hembra, demostrándose tanto la presencia de los ARNm como sus proteínas, si bien su distribución subcelular es diferente. El ER_α se encuentra situado predominantemente en el espacio extranuclear, concentrándose en las proximidades de la membrana nuclear. Por el contrario, el ER_β tienen una localización mucho menos abundante en el citoplasma a favor del marcaje nuclear. Ambos subtipos del RE conservan la capacidad de moverse subcelularmente entre el núcleo y el citoplasma en presencia de su ligando endógeno. Este tráfico es bloqueado por el antiestrógeno ICI182780, cuya presencia previa impide la localización nuclear de estos receptores en respuesta al E_2 y disminuye notoriamente la intensidad de ambos marcajes.

Discusión

La principal señal neural responsable de las variaciones circadianas de la síntesis y liberación de melatonina es la NE liberada desde los terminales simpáticos procedentes del GCS. Teniendo en cuenta este control noradrenérgico de la función pineal y en base a evidencias previas obtenidas en nuestro laboratorio (Hernández et al., 2001), hemos planteado nuestro trabajo bajo la hipótesis de que el estradiol es capaz de controlar la biosíntesis de la melatonina modulando los receptores de membrana que reciben la aferencia noradrenérgica en el pinealocito. Esto se reflejaría, a su vez, en modificaciones de los segundos mensajeros y metabolitos que componen las rutas metabólicas pineales. Por esta razón hemos utilizado como modelo experimental tanto células pineales dispersas como glándulas enteras procedentes de ratas hembra ovariectomizadas bilateralmente y expuestas, *in vivo* o *in vitro*, a la acción del E₂. A lo largo del presente estudio hemos determinado la acción de este esteroide sobre diferentes puntos de la cadena de segundos mensajeros asociados a los receptores de membrana α / β -adrenérgicos. Para ello han sido utilizados agonistas específicos de ambos tipos de receptores. Con este planteamiento, se ha estudiado:

- 1) El efecto del E₂ sobre los mecanismos de señalización intracelular determinando el incremento de los niveles de AMPc, la acumulación de inosítoles fosfato, o la acumulación de indoles en células estimuladas adrenérgicamente, utilizando ensayos inmunoenzimáticos (EIA), medida de la acumulación de [³H]-IPs y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), respectivamente.
- 2) Las consecuencias de tales acciones sobre la cinética enzimática de la sNAT mediante un ensayo enzimático acoplado a HPLC.
- 3) La expresión y modificación de la capacidad de ligado mediante la "RT-PCR" y ensayos de ligado con [¹²⁵I]-Yodocianopindolol, del receptor de membrana β ₁-adrenérgico en pinealocitos cultivados y sometidos a las condiciones experimentales específicas del presente estudio.
- 4) La identificación, expresión y distribución subcelular de los subtipos del RE (α y β) presentes en los pinealocitos, utilizando técnicas de "RT-PCR", "Western blot" e inmunofluorescencia.

CARACTERIZACIÓN DE LA ACCIÓN DEL ESTRADIOL

1. Efecto del estradiol sobre la respuesta adrenérgica

La estimulación de los receptores adrenérgicos de membrana produce una rápida activación de todo el metabolismo pineal, dominada principalmente por el incremento del AMPc provocado por la estimulación de la vía β -adrenérgica, y potenciada a su vez por la activación de la vía α_1 -adrenérgica (Ho y Chik, 1990; Reiter, 1991). En este trabajo hemos estudiado el efecto del E_2 sobre los segundos mensajeros asociados a cada una de las respuestas α/β -adrenérgicas. La exposición *in vitro* de pinealocitos procedentes de rata ovariectomizada a un amplio rango de concentraciones de E_2 (10^{-12} M- 10^{-7} M), resultó en una respuesta compleja dependiente de la dosis. En el caso de la acumulación de AMPc inducida por ISO, el efecto del E_2 parece tener carácter bifásico (Fig. 11), ya que se pueden distinguir dos componentes distintos en el ajuste de esta curva de concentraciones, ambos descritos por ajustes no lineales: una exponencial negativa para el rango 0- 10^{-10} M de E_2 y una hipérbola positiva para las concentraciones comprendidas entre 10^{-10} - 10^{-7} M de E_2 . También investigamos el efecto de la concentración de E_2 sobre la acumulación de inosítoles fosfato en respuesta a la estimulación de la vía α_1 -adrenérgica pineal como índice del grado de activación de la PLC, ya que esta señal tiene un efecto potenciador sobre la desencadenada por activación β -adrenérgica. Los resultados obtenidos muestran que el efecto del E_2 sobre la acumulación de [3 H]-IPs tras la estimulación α_1 -adrenérgica también presenta un patrón bifásico, pero con un potencial inhibitorio por parte del E_2 mucho menor, ya que sólo se alcanza una inhibición máxima del 20 % con respecto al 60% descrito para el AMPc.

Diversos autores han aportado evidencias que implican a los esteroides ováricos en la regulación de la producción de AMPc y la hidrólisis de PIP_2 en respuesta a la estimulación con NE de la glándula pineal (Weiss y Crayton, 1970; Davis, 1978; Favit et al., 1991). Los datos obtenidos en otros tejidos han

ilustrado el posible mecanismo implicado en la modulación de la respuesta adrenérgica por parte de las hormonas ováricas. Especialmente interesantes son los trabajos realizados utilizando como modelo experimental rodajas de área preóptica (APO) e hipotálamo medio basal (HMB) procedentes de ratas OVX tratadas con E₂, estimuladas *in vitro* con agonistas adrenérgicos. La importancia de este modelo radica en que los sistemas de transducción intracelular asociados a receptores α/β -adrenérgicos son prácticamente idénticos a los descritos en el pinealocito (Petitti y Etgen, 1991; Karkanias et al., 1995). En la misma dirección, la exposición *in vitro* de células de la granulosa procedentes de ovarios humanos a diferentes concentraciones de E₂, comprendidas dentro del rango fisiológico (0.36-36 x 10⁻⁹ M), disminuyeron los niveles basales de AMPc (Sirotkin et al., 1994).

A la hora de comparar los efectos de los esteroides ováricos sobre la señal de AMPc inducida por la estimulación adrenérgica en el pinealocito con los resultados obtenidos en rodajas de áreas cerebrales, APO y HMB fundamentalmente, se ha destacado la similitud existente entre ambos modelos, en referencia a los receptores implicados y los mecanismos de segundos mensajeros asociados a los mismos. No obstante, los cultivos de células pineales dispersas suponen un modelo sencillo que facilitaría la interpretación de los resultados. Por el contrario, los fragmentos de áreas cerebrales constituyen una red de neuronas que aún mantienen sus conexiones y, por tanto, se hace difícil distinguir entre efectos pre- o postsinápticos, o determinar si el efecto observado es el balance final de una modulación de signo inhibitor o estimulador ejercida por esteroides sobre las diferentes poblaciones neuronales que conforman el área en estudio. Además, en el presente trabajo se han expuesto las células a un amplio rango de dosis de E₂ *in vitro* (10⁻¹² M-10⁻⁷ M), lo que nos permite asegurar que los efectos observados son debidos a acciones ejercidas por la hormona directamente sobre los pinealocitos y que además este tipo celular es extremadamente sensible a estas variaciones hormonales. Previamente han sido constatados efectos bifásicos dependientes de la dosis de E₂ en otros tejidos y situaciones experimentales (Hayashi et al., 1994; Parini et al., 2000), incluso se ha descrito rangos efectivos de concentraciones muy similares en cultivos primarios de

osteoblastos (Chen et al., 1991). Los datos *in vivo* nos muestran que durante el ciclo ovárico de la rata, las variaciones más bruscas del metabolismo pineal y de la respuesta de la glándula a la estimulación adrenérgica suceden durante la fase de proestro (Weiss y Crayton, 1970; Davis, 1978; Johnson et al., 1982; Moujir et al., 1990b). En consonancia con estas observaciones, la concentración de E₂ capaz de disminuir la respuesta a la estimulación de los receptores α_1/β -adrenérgicos en el pinealocito es incluso más baja que la que existe en el torrente sanguíneo durante el pico de estrógeno que precede a la ovulación. Es posible que la sensibilidad a bajas concentraciones de E₂ dependa de una serie de factores, entre los que se pueden incluir el tipo celular, el subtipo de RE predominante o la importancia de la vía de señales modulada por el estrógeno en cada célula.

Una serie de evidencias experimentales procedentes de estudios *in vivo* reflejan también una respuesta bifásica del E₂ que dependería de su concentración en sangre (Oyekan y Botting, 1990; Cutler, 1997). Así pues, nos planteamos administrar el tratamiento estrogénico al animal entero con objeto de confirmar los resultados descritos en pinealocitos dispersos. Para ello se utilizó un modelo experimental donde el E₂ era administrado subcutáneamente y, tras su extirpación inmediatamente después del sacrificio, la glándula entera era estimulada *in vitro* con NE. En estos experimentos, a todos los animales tratados con E₂ se les inyectó una sola dosis de Pg ($2,5 \times 10^{-4}$ g/rata) con el fin de simular el patrón hormonal cíclico de la rata. Los resultados obtenidos *in vivo* han corroborado el efecto bifásico descrito para el pinealocito disperso, observándose una inhibición de la acumulación de AMPc cuando se administraron dosis de E₂ comprendidas entre 10^{-10} - 10^{-7} g/rata, mientras que con concentraciones de E₂ de 10^{-5} g/rata no se observó el efecto inhibitorio, alcanzándose valores similares al vehículo sin tratamiento hormonal (Fig. 16).

Los efectos bifásicos del estradiol en diferentes sistemas celulares no pueden considerarse infrecuentes, si bien sólo recientemente ha sido posible interpretarlo a la luz de los conocimientos actuales en relación a la diversidad de receptores estrogénicos. Teóricamente, la presencia de más de un tipo de receptor para estradiol en un determinado tipo celular podría justificar una acción de tipo bifásico por: 1) una diferente afinidad de la hormona por los

subtipos de su propio receptor, ER α y ER β (Brzozowski et al., 1997); 2) la versatilidad descrita, estimuladora o inhibidora de la transcripción, según el tipo celular (Weihua et al., 2000); y/o 3) la dependencia de promotores distintos o la expresión diferencial de cada subtipo del RE (Paech et al., 1997; Weihua et al., 2000). Cualquiera de estas posibilidades, o una combinación de todas ellas, podría justificar que el estradiol sobre la pineal pueda tener, dependiendo de la dosis, efectos contrapuestos. En cualquier caso, que los efectos del estradiol sobre diferentes rutas metabólicas pineales sean mediados por interacciones con uno o varios tipos de receptores estrogénicos, se ve apoyado por el hecho de que, en nuestro modelo in vivo, la acción del E₂ fue bloqueada por dos moléculas SERMs como son el LY-117018 y el Raloxifeno (Fig. 20). Capacitadas, según el tipo celular, para bloquear o imitar la acción de los estrógenos al interactuar con su receptor (Kuiper et al., 1998b).

2. Curso temporal, lugar de acción y esteroespecificidad del efecto del E₂

Con el fin de caracterizar el efecto inhibitorio del E₂ sobre la estimulación adrenérgica, se llevaron a cabo experimentos en relación con el tiempo de exposición al estrógeno, intentando además ver si su acción se ejerce a nivel de la membrana celular o intracelular, así sus efectos son reproducidos o no por su isómero el 17 α -E₂.

Del análisis conjunto de los datos procedentes de tales estudios se puede concluir que el E₂ podría ejercer tales efectos a través de un mecanismo genómico, en el que se encontrarían involucrados posiblemente sus receptores intracelulares. Son varios los hechos en los que se basa esta hipótesis, y que descartan una posible acción del E₂ a nivel de la membrana plasmática, de naturaleza no genómica, como la causa directa de las acciones llevadas a cabo sobre la respuesta adrenérgica en los pinealocitos. Por un lado, el E₂-BSA no tiene efecto alguno ni a nivel de AMPc, una señal muy próxima a la membrana celular, ni sobre la actividad sNAT, enzima situada al final de la ruta biosintética de la melatonina (Fig. 15). Además, es importante señalar que los efectos ejercidos por el E₂ a nivel de membrana se observan, generalmente, cuando las dosis de estrógeno utilizadas son del orden micromolar (Kitazawa

et al., 1997; Valverde et al., 1999; Nadal et al., 2001), mientras que nuestros resultados muestran que el E_2 disminuyó la sensibilidad del pinealocito a la estimulación adrenérgica a concentraciones tan bajas como 2×10^{-11} M (Fig. 11 y 12). Este hecho tiene, a nuestro entender, una enorme importancia, puesto que no hay que olvidar a la hora de valorar la relevancia biológica de los efectos derivados del tratamiento con E_2 , que se produce la inhibición cuando las células se exponen a dosis del esteroide comprendidas dentro del rango fisiológico.

Cuando tratamos de determinar el tiempo de exposición a E_2 necesario para provocar una atenuación de la respuesta a la estimulación adrenérgica, observamos que la disminución en la acumulación de AMPc tras la estimulación con ISO se produce una vez transcurridas 48 horas de la exposición a E_2 , pero sin la necesidad de que exista una incubación continua con la hormona, puesto que tiempos tan cortos como los de 5 minutos son suficientes (Fig. 13), lo que posiblemente suponga el tiempo necesario para que la hormona difunda al interior celular y se una al receptor. De estas observaciones se deduce que, independientemente de que tiempos de exposición a E_2 inferiores a 1 hora sean capaces de disminuir la respuesta a ISO, dicho efecto sólo se hace patente tras una latencia de 48 horas desde el inicio de la incubación con el estrógeno. Dicha latencia, junto con la incapacidad del E_2 -BSA para reproducir el efecto del E_2 libre, constituyen indicios a favor de que el esteroide ejerce sus acciones a través un mecanismo de naturaleza genómica.

Seguidamente abordamos la esteroespecificidad del efecto estrogénico descrito en los pinealocitos, mediante experimentos con el mismo patrón de exposición hormonal en los que se comparaba el efecto del $17\alpha E_2$ frente al $17\beta E_2$ a las mismas dosis, comprobándose que existía similitud entre las acciones de ambos isómeros sobre la respuesta α/β -adrenérgica (Fig. 15). Evidencias previas en otros tejidos y tipos celulares han constatado el efecto biológico del $17\alpha E_2$ durante las etapas postnatales del desarrollo sobre el tejido reproductor, que luego pasa a ser inactivo sobre el mismo tejido cuando el animal es adulto (Hajek et al., 1997). En nuestro modelo hemos utilizado ratas prepúberes de 20 días, por lo que es lógico pensar que el $17\alpha E_2$ pueda

tener actividad biológica relevante a estas edades sobre un tejido con receptores estrogénicos y directamente relacionado con el control de la función reproductora. Por otra parte se ha publicado un claro efecto del $17\alpha\text{-E}_2$, muy similar al del $17\beta\text{-E}_2$, a nivel de la activación por fosforilación de la proteína quinasa activadora de la mitogénesis (MAPK) y la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), por lo que ambos isómeros podrían estar activando estas importantes vías de señalización intracelular (Singh et al., 2000; Wade et al., 2001). Es posible que los factores que explican el potencial transcripcional y carácter agonista/antagonista del $17\alpha\text{-E}_2$ en los diferentes tejidos estén condicionados por las características de los subtipos del RE que se expresen en los mismos, así como por la afinidad de cada isómero por sus receptores (Barkhem et al., 1998). Así pues, el que en la glándula pineal se encuentre un subtipo u otro del RE o lo hagan con distinto nivel de expresión, puede condicionar esta similitud en la actividad biológica de ambos isómeros del E_2 .

IDENTIFICACIÓN DE LA DIANA MEDIADORA DEL EFECTO DEL ESTRADIOL

Por simplificación, hemos limitado el estudio a la vía β -adrenérgica, por ser la más importante en el control de la función pineal y haber obtenido los efectos más claros en los estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

La presencia del estrógeno en el medio de cultivo disminuye la acumulación de AMPc inducida por el ISO en un rango determinado de concentraciones. Inicialmente, esta respuesta podría ser debida a un efecto inhibitorio del estrógeno sobre una o diferentes proteínas implicadas en la activación de la vía β -adrenérgica. En nuestro laboratorio ya se había demostrado que el E_2 no regulaba de forma directa la actividad AC, ya que la incubación de las células en presencia de la hormona, en concentraciones capaces de reducir la acumulación de AMPc inducida por ISO, no tuvo efecto sobre los niveles de AMPc medidos tras la estimulación con FK, un conocido activador directo de la AC (Hernández et al., 2001). De forma similar, la administración de E_2 a ratas OVX no modificó la actividad AC inducida por la incubación con FK en rodajas de APO y HMB (Etgen y Petitti, 1987) o de

fragmentos de membranas obtenidas de ambas regiones cerebrales (Ungar et al., 1993). Con objeto de saber si el E₂ puede desarrollar su acción cuando la AC está plenamente estimulada y por tanto todos los procesos de proteínas quinasas dependientes de AMPc activados, nos planteamos administrar FK (10⁻⁴ M, 1h) previamente a la exposición hormonal, saltándonos así el receptor de membrana y estimulando la vía antes de que el E₂ pudiese hacer su efecto. Transcurridas las 48 h se procedió a la estimulación celular con ISO, comprobándose un incremento en la producción de AMPc, pero no observándose el efecto inhibitorio del E₂ descrito en los apartados anteriores sobre este mensajero. Utilizando la línea celular MCF-7, que expresa abundantemente el RE, Lahooti y colaboradores (1990) encontraron que el tratamiento con FK durante 15 min. tuvo el efecto de revertir hasta un 50 % la fosforilación inducida por E₂ de la proteína hsp90. Otros datos indican un posible bloqueo de la acción del E₂ por parte de la FK durante 1h, a través de un incremento en la fosforilación de la Tirosina Hidroxilasa (TH) en neuronas del hipocampo (Arbogast y Hyde, 2000). Así pues, la anulación del efecto estrogénico visto por la adición previa de FK nos podría sugerir que el E₂, en nuestro modelo, podría ejercer su acción por mecanismos de fosforilación y desfosforilación que implicarían la intervención de proteínas quinasas.

El E₂ podría también ejercer su efecto teniendo como diana final las proteínas Gs, o los propios receptores adrenérgicos, a través de modificaciones del número y/o afinidad de estos últimos. En este sentido se ha constatado que tratando con E₂ a conejos hembra OVX se reduce la producción de AMPc en el miometrio tras la estimulación con ISO, a través de una reducción en la concentración de proteína Gs (Riemer et al., 1988]. Sin embargo, en rodajas de hipocampo y área preóptica se ha observado que la administración de E₂ *in vivo* no induce inactivación o disminución en la cantidad de proteínas Gs (Ungar et al., 1993). En nuestro caso los resultados obtenidos apuntan en esta dirección, al no haber modificación en la actividad de proteínas Gs inducida por toxinas bacterianas tras el tratamiento con E₂ (Fig. 22). Los resultados obtenidos por otros laboratorios respecto al hipotálamo y la región preóptica se han interpretado en el sentido de que el estrógeno podría actuar modulando los mecanismos de desensibilización del

receptor β -adrenérgico y, de esta forma, inducir un desacoplamiento entre el propio receptor y la proteína Gs (Ansonoff y Etgen, 2000). Los procesos de desensibilización referidos a los receptores adrenérgicos han sido ampliamente descritos para el subtipo β_2 (Lohse, 1993; Hein y Kobilka, 1995), distinguiéndose dos mecanismos. El primero de ellos, denominado desensibilización heteróloga, se encuentra mediado por la PKA, la cual, tras ser activada por la elevación de los niveles intracelulares de AMPc, podría fosforilar a los receptores β -adrenérgicos e inducir su inactivación. Sin embargo, este mecanismo es poco específico, puesto que: 1) la PKA puede catalizar reacciones de fosforilación sobre receptores no ocupados por el agonista; y 2) la inactivación de un receptor β mediante la PKA puede ser mediado por otro tipo de receptor diferente, también acoplado a proteínas Gs, de ahí la denominación de heteróloga (Hein y Kobilka, 1995). No obstante, se ha descrito un segundo mecanismo denominado desensibilización homóloga, bastante más específico que el anterior. En él se encuentran involucradas una familia de quinasas que fosforilan receptores acoplados a proteínas Gs (GRK) y que estén ocupados por un agonista. Así se han descrito subtipos de GRK específicos para diferentes receptores, tales como rodopsina quinasa, receptor β -adrenérgico-quinasa 1 y 2 (β -ARK1, β -ARK2), etc.. (Lefkowitz, 1993; Haga et al., 1994). La inactivación del receptor β_2 -adrenérgico mediante desensibilización homóloga requiere además de la participación de unas proteínas denominadas β -arrestinas, las cuales se unen al receptor una vez que este ha sido fosforilado por las GRK, induciendo su desacoplamiento de las proteínas Gs (Lohse et al., 1990). Teniendo todo ello en cuenta, no cabría descartar la posibilidad de que, como mecanismo general, el E_2 disminuyese la producción de AMPc o la actividad AC en respuesta a la estimulación β -adrenérgica mediante un mecanismo que implicase un incremento en la expresión y síntesis de la β -arrestina o de la β -ARK. En este sentido se ha demostrado que, en líneas celulares obtenidas a partir de ovario de hámster, una elevada tasa de expresión de ambas proteínas ocasiona un incremento considerable en la desensibilización homóloga del receptor β_2 -adrenérgico tras su estimulación con ISO (Pippig et al., 1992).

Por otra parte, además de modular la eficiencia de la transducción intracelular de la señal noradrenérgica, un segundo mecanismo de acción del E₂ podría consistir en la regulación de la densidad y/o afinidad de los receptores β-adrenérgicos. En este sentido se ha constatado que la atenuación de la respuesta a ISO en hipotálamo y área preóptica ejercida por el estrógeno no se ve acompañada de una modificación de ambos parámetros (Etgen et al., 1992; Ungar et al., 1993). Sin embargo, no cabe descartar la posibilidad de que tal mecanismo participe en los efectos del E₂ sobre la respuesta β-adrenérgica descrito en el presente estudio, ya que previamente se ha descrito una disminución en el número de receptores β-adrenérgicos en la pineal de ratas OVX y tratadas con E₂ (Weiland y Wise, 1989; Yie y Brown, 1995), efecto que tiene su reflejo en el descenso en la producción de melatonina en respuesta a la administración de ISO *in vivo* (Yie y Brown, 1995). Así pues, diseñamos experimentos encaminados a intentar dar respuesta a la pregunta de si el E₂ regula la densidad y/o afinidad de los receptores β-adrenérgicos en los pinealocitos, ya que, como hemos mostrado, al parecer no lo hace a nivel de modificación de la expresión de las proteínas Gs. En primer lugar, mediante la técnica semicuantitativa de la “RT-PCR” analizamos si el E₂ modificaba la expresión del β₁-adrenérgico, comprobando que no existían diferencias significativas cuando las células se trataban con E₂ en cuanto a la expresión del ARNm específico de este receptor. No obstante, este resultado debe ser interpretado con cautela, puesto que pueden haber modificaciones postranscripcionales de ese ARNm los cuales se traduzcan en una disminución de la proteína expresada, o bien no disponer de suficiente sensibilidad para detectar cambios con esta técnica. Para tener mayor seguridad existían dos opciones, o cuantificar la proteína receptora por “Western blot”, o estudiar la capacidad de unión de la misma por sus ligandos. En nuestro caso nos decidimos por la segunda, puesto que este abordaje nos permitía contestar a la pregunta de si hay menos cantidad de proteína o no, y de si esa proteína modifica su afinidad por el ligando en células tratadas con E₂. Mediante el yodo-cyanopindolol marcado con [¹²⁵I] pudimos comprobar que el tratamiento con E₂ (2x10⁻¹¹ M, 48h) ejerció una importante modificación en la capacidad de ligado del receptor β₁-adrenérgico, la cual se vió reflejada en una

inhibición de su máxima capacidad de unión al ligando (B_{max}) y en su constante de disociación (K_d). El efecto del E_2 sobre estas variables se traduciría ,respectivamente, en una disminución del 30 % en número de receptores disponibles en la membrana y en una inhibición del 40 % en la afinidad de cada receptor por su ligando. Teóricamente, podría sugerirse como mecanismo utilizado por el E_2 para disminuir el número de receptores la modificación postranscripcional de su ARNm, o incluso el incremento del secuestro, internalización y degradación del la proteína receptora, como se ha sugerido previamente para la misma en el caso de la corteza frontal (Sibley et al., 1987; Bouvier et al., 1989). También ha sido descrita una pérdida de sensibilidad en receptores β -adrenérgicos producida por estrógenos, mediante un mecanismo que implicaría la disminución en la tasa de desfosforilación de estos receptores de membrana fosforilados vía PKA/PKC (Ansonoff y Etgen, 2000). A la luz de estos resultados podría decirse que la principal diana mediadora del efecto del E_2 en la pineal es el receptor de membrana β_1 -adrenérgico, siendo éste, a su vez, el que domina la vía más importante de control funcional de la glándula.

IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES INTRACELULARES PARA EL ESTRADIOL EN EL PINEALOCITO

El efecto bifásico del E_2 , la latencia necesaria para observar su efecto y la incapacidad de una molécula no permeable (E_2 -BSA) para reproducirlo, nos llevó a pensar en la posibilidad de la existencia de más de un subtipo de receptor estrogénico en la pineal que mediase esta acción dual. El análisis de los pinealocitos por medio de las técnicas complementarias, como la "RT-PCR", el "Western blot" o la inmunofluorescencia, reveló la presencia en los pinealocitos de las dos formas del RE (α y β) (Fig. 27, 28 y 30). Estos datos confirman hallazgos antiguos mediante análisis de intercambio con [3 H]- E_2 en la pineal de la rata, habiéndose detectado un lugar receptor nuclear sin especificar el subtipo, cuya abundancia variaba durante el ciclo del estro (Cardinali, 1977). Más recientemente, también se ha demostrado mediante hibridación *in situ* la presencia en la glándula del RNAm del RE β (Shughurue et

al., 1997). Nuestro estudio ha demostrado, además, que la distribución subcelular de cada subtipo de RE es diferente, puesto que el RE α es mucho más abundante y con localización predominantemente a nivel citoplasmático, llegando a tener un marcaje perinuclear. (Fig. 30 A, B, y C). Por su parte, el RE β tiene una menor expresión y además se localiza en el interior nuclear (Fig. 30 A, B y C), observándose menos en el citoplasma, con la excepción del tejido conjuntivo pineal. La existencia de dos subtipos diferentes del RE puede modificar significativamente la actividad final de un tipo celular, puesto que estas isoformas del RE poseen patrones diferentes de afinidad por sus elementos de respuesta a estrógeno (EREs) (Kuiper y Gustafsson, 1997; Hyder et al., 1999). Incluso, se ha demostrado que el RE β modula los efectos del RE α en un tejido donde el segundo es mayoritario, como es el útero (Weihua et al., 2000), situación muy similar al caso de la pineal. De esta manera se ha observado en líneas celulares transfectadas con el promotor AP-1 (propio de los factores de transcripción c-fos y *junc-c*) acoplado al gen de la luciferasa, que tanto el E₂ como tres SERM diferentes (tamoxifeno, ICI164384 y raloxifeno), incrementaron la expresión de proteínas activando al RE α , mientras que, actuando a través del RE β , la transcripción fue activada por los SERM, no ejerciendo efecto alguno el E₂ (Paech et al., 1997). De acuerdo con estos resultados, las acciones ejercidas por el E₂ o un determinado SERM van a estar condicionadas por las características del tejido en donde se desarrollan (Conneely et al., 2001). Por último, debe destacarse que, tras su activación, el RE puede llevar a cabo su actividad bajo la forma de homodímeros (α o β) o heterodímeros $\alpha\beta$ (Pettersson et al., 1997; Ogawa et al., 1998). Este hecho le concede una especial relevancia al balance existente entre ambas formas de la proteína, ya que probablemente el tipo de dimerización condicione con qué tipos de promotores y factores de transcripción va a interaccionar el receptor una vez activado (Kuiper y Gustafsson, 1997; McInerney et al., 1998; Kuiper et al., 1998b), lo que podría explicar quizás el patrón bifásico que observamos en la curva dosis respuesta del E₂ en nuestros experimentos (Fig. 11, 12, 16 y 18).

Por otro lado, fue importante comprobar mediante “Western blot” cómo la proteína del ER α , mayoritario en la pineal, era sobre-expresado por su

ligando endógeno (Fig. 29), por lo que cabe la posibilidad de que este receptor esté actuando a nivel nuclear para modificar en definitiva su propia expresión génica, como ya previamente demostró Prange-Kiel y colaboradores (2001) para este mismo subtipo del ER en cultivos celulares del endometrio humano. No obstante, no apreciamos un aumento demostrativo en la proteína del RE β , debido quizás a que este subtipo se encuentra en mucha menos cantidad en el pinealocito, lo que dificultaría ver su posible regulación por parte del E $_2$. En cualquier caso, los datos aportados constituyen claras evidencias del dinamismo dependiente de E $_2$ de estos receptores, lo cual es crítico para proporcionar una respuesta eficaz durante el ciclo ovárico de los mamíferos, periodo en el que fluctúan notoriamente los niveles de E $_2$ en sangre (Fig. 5). De acuerdo con esto, se ha demostrado en la pineal un cambio en la unión de [3 H]-E $_2$ al RE, sin especificar el subtipo, con un máximo durante la fase de proestro o tras la administración del estrógeno (Cardinali, 1977). Nuestros resultados de inmunofluorescencia (Fig. 31) indican que el E $_2$ provoca movimientos entre los compartimentos citoplasmático-nuclear, los cuales son realizados en periodos cortos de tiempo (15-30 min.), posibilitándose una concentración masiva de estos receptores en el núcleo (Fig. 31 A-F). Posteriormente, de manera paulatina, se va perdiendo esta señal nuclear del RE a favor de una ubicación citoplasmática en el caso del RE α , conservándose parcialmente la localización nuclear por parte del RE β a las 2 horas de la adición de la hormona (Fig. 31. F,G y H). Resultados similares a los nuestros ya se habían descrito en células COS-1 transfectadas con el RE, donde se apreciaba un claro incremento en el marcaje nuclear tras el tratamiento con E $_2$ (10^{-8} M, 1h) (Dauvois et al., 1993). Por otro lado, estos y otros autores hablan de que no siempre es necesaria la unión de la hormona a su receptor para que éste se mueva activamente entre el núcleo y el citoplasma, llegando a establecerse un equilibrio dinámico. En este contexto, numerosos estudios se han centrado en el papel que desempeñan las HSP-90 en la localización nuclear de estos receptores (Dauvois et al., 1993; Kang et al., 1994). Este dinamismo de los subtipos del RE en el pinealocito, posibilitaría que se puedan dar acciones moduladoras diferentes sobre la función pineal a través de interacciones con uno u otro subtipo del RE.

Los movimientos entre los compartimentos intracelulares de ambos RE (α y β), fueron bloqueados en nuestro estudio por la molécula antiestrogénica ICI182780 (comparar Fig. 31 con Fig. 32), que posee la capacidad de impedir la traslocación núcleo-citoplasma inactivando así el RE (Dauvois et al. 1993). La presencia previa de esta molécula atenuó drásticamente el marcaje para ambos receptores, perdiéndose prácticamente la señal nuclear, tal vez debido a que el antiestrógeno afectó los niveles de la forma estable del RE a través de una reducción en la vida media de esta proteína e incremento de su degradación (Dauvois et al. 1992; Reese and Katzenellenbogen, 1992). Alternativamente, una posible explicación para el efecto del ICI sobre el bloqueo del movimiento de los receptores estrogénicos podría ser la de que esta molécula interfiera con la desfosforilación del RE e inhiba su traslocación, como ocurre en el caso del receptor de glucocorticoides (De Franco et al., 1991). El significado funcional de estos movimientos de ambos RE (α y β) en el pinealocito no está claro, pero podrían estar implicados en el acoplamiento a su vez de estos receptores a otras vías de señalización, dado que, tal y como hemos demostrado en la presente memoria, el E_2 modula el funcionamiento de los sistemas de transducción intracelular de las señales α/β -adrenérgicas. El pinealocito se ofrece por ello como un excelente modelo donde estudiar a un nivel celular los mecanismos que subyacen en la interacción entre neurotransmisores y receptores hormonales. En esta dirección, la presencia en el pinealocito del RE α y RE β ofrece un amplio abanico de posibilidades, ya que la NE, y tal vez otros neuromoduladores, podría regular de forma diferente ambos subtipos del receptor, lo que a su vez determinará el efecto del E_2 sobre la respuesta del pinealocito al neurotransmisor.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La exposición de células pineales procedentes de ratas ovariectomizadas prepúberes a diferentes concentraciones de E_2 , o el tratamiento *in vivo* de animales en las mismas condiciones experimentales, tiene un efecto bifásico y dependiente de la dosis sobre la respuesta pineal a la estimulación adrenérgica. Ello se traduce en una inhibición, a dosis bajas, de la acumulación de inosítoles fosfatos y AMPc tras activación de α_1 - y β -adrenoceptores, respectivamente.
2. Estos efectos son relevantes para la regulación de la actividad metabólica pineal, puesto que también se observan a nivel de la cinética del enzima sNAT, paso limitante en la síntesis de melatonina y diana final de las diferentes señales activadas por la estimulación adrenérgica.
3. En los modelos utilizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, las concentraciones más efectivas de E_2 se correspondieron con sus oscilaciones fisiológicas durante las horas que preceden a la ovulación en la rata hembra.
4. El patrón temporal característico de estos efectos (latencia de 48 h tras la retirada del estrógeno), junto al hecho de que no sean reproducidos cuando el E_2 es administrado a las células pineales en forma no-permeante (acoplado a BSA), sugieren que se trate de un mecanismo mediado por receptores intracelulares, probablemente de tipo genómico.
5. A la dosis más efectiva (10^{-9} M), el 17α - E_2 mostró efectos similares al 17β - E_2 , lo que podría deberse a la mayor actividad biológica descrita para el isómero α en ratas de edades similares a las del estudio, y posiblemente esté relacionado con la existencia de más de un subtipo del RE con afinidades y niveles de expresión diferentes en la pineal de la rata hembra.

6. La exposición a E_2 de células pineales en cultivo no afectó la acumulación de AMPc inducida por toxina colérica o por forskolina, lo que sugiere que el efecto modulador del estrógeno sobre la vía β -adrenérgica debe ejercerse a través de modificaciones a nivel del β -adrenoceptor, y no a nivel de las proteínas Gs o el enzima AC.
7. Confirmando lo anterior, el tratamiento con E_2 fue capaz de modificar la máxima capacidad de unión ($B_{m\acute{a}x.}$) y la constante de disociación (K_d) del receptor β -adrenérgico presente en membranas pineales procedentes de ratas ovariectomizadas a un ligando altamente específico, sin observarse modificaciones significativas en la cantidad del ARNm que codifica para esta proteína.
8. El efecto bifásico del estrógeno, así como su posible mecanismo genómico de acción, podrían ser consecuencia de la expresión, localización y distribución celular diferencial de ambos subtipos de receptores estrogénicos (α y β) en los pinealocitos. Lo cual, además, se ve apoyado por la demostración de tráfico entre el citoplasma y el núcleo de estos receptores en presencia de E_2 , así como por el bloqueo de estos movimientos en presencia del antiestrógeno ICI182780.
9. El conjunto de resultados descritos indican que el estradiol, en un rango de concentraciones equivalente al de sus oscilaciones fisiológicas en la rata hembra, es capaz de modular la actividad pineal inducida por estimulación adrenérgica. Si bien los mecanismos de acción precisos no han sido aún aclarados, los resultados obtenidos son compatibles con la activación estrógeno-dependiente de uno o varios receptores intracelulares, lo que se traduciría en la modificación en el número y/o estado funcional del receptor de membrana β_1 -adrenérgico y tal vez otras dianas proteicas pineales.

Bibliografía

- ALEXANDER B, DOWN AJ, WOLFSON A (1970): Effects of prepuberal hypophysectomy and ovariectomy on hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the female rat. *Endocrinology* **86**:1166-1168.
- ALONSO R, ABREU P, FAJARDO N (1993): Steroid influences on pineal melatonin production. In Reiter H-SYaRJ (ed): *"Melatonin, Physiological Effects, and Clinical Applications."* London: CRC Press.
- ALONSO R, ABREU P, FAJARDO N, HERNÁNDEZ F, DÍAZ-CRUZ A, HERNÁNDEZ G, SÁNCHEZ-CRIADO J (1995): Ovarian hormones regulate α_1 - and β -adrenoreceptor interactions in female rat pinealocytes. *NeuroReport* **6**:345-348.
- ALONSO R, LÓPEZ-COVIELLA I (1998): Gonadal steroids and neuronal function. *Neurochemical Research*. **23**:679-692.
- ALONSO R (2001): La glándula pineal. In Tresguerres. JM (ed): *"Fisiología Médica."* Ed. Interamericana. McGraw-Hill, pp 928-938.
- ANSONOFF MA, ETGEN AM (2000): Evidence that oestradiol attenuates β -adrenoceptor function in the hypothalamus of female rats by altering receptor phosphorylation and sequestration. *J. Neuroendocrinology*. **12**: 1060-1066.
- ARBOGAST LA, HYDE JF (2000): Estradiol attenuates the forskolin-induced increase in hypothalamic tyrosine hydroxylase activity. *Neuroendocrinology*. **71**: 219-27.
- AXELROD J, WEISSBACH H (1960): Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* **131**:1312.
- BALER R, COVINGTON S, KLEIN DC (1997): The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. *The Journal of Biological Chemistry* **272**:6979-6985.
- BARKHEM T, CARLSSON B, NILSSON Y, ENMARK E, GUSTAFSSON J, NILSSON S (1998): Differential response of estrogen receptor α and estrogen receptor β to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular Pharmacology*, **54**: 105-112.
- BAULIEU E, ROBEL P (1995): Non genomic mechanism of action of steroids hormones: *"Non-reproductive actions of sex steroids (Ciba symposium 1991)."* Chichester: John Wiley & Sons, pp 24-42.
- BERRIDGE MJ, DAWNES CP, HALLEY MR (1982): Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochemical Journal* **206**: 587-595.
- BERRY M, METZGER D, CHAMBAN P (1990): Role of two activating domains of the estrogen receptor in the cell-type and promoter context dependent agonist activity of the antiestrogen 4-hydroxitamoxifen. *EMBO J*. **9**:2811-2818.
- BERTHOIS Y, KATZENELLENBOGEN JA, KATZENELLENBOGEN BS (1986): Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:2496-2500.

BHAT RA, HARNISH DC, STEVIS PE, LYTTLE CR, KOMM BS (1998): A novel human estrogen receptor beta: identification and functional analysis of additional N-terminal amino acids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **67**:233-240.

BITTMAN EL (1984): Melatonin and photoperiodic time measurement: evidence from rodents and ruminants. In Reiter RJ (ed): "*The Pineal Gland.*" New York: Raven Press, pp 155-192.

BLUMBERG DD (1987): Creating a ribonuclease-free environment. *Meth. Enzymol.* **152**: 20-24.

BORIGIN J, WANG MM, SNYDER S (1995): Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* **378**:783-785.

BOUGUET MT, KOMAR V, STRICKER C, CHAMBON P, GRONEMEYER H (1989): The contribution of the N- and C-terminal regions of the steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell specific. *Nucleic Acids Res.* **17**:2581-2595.

BOUVIER M, COLLINS S, O'DOWD BF, CAMPBELLPT, DE BLASI A, KOBILKABK, MACGREGOR C, IRONS GP, CARON MG, LEFKOWITZ RJ (1989): Two distinct pathways for AMP-mediated down-regulation of the β_2 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**: 16786-16792.

BRADFORD M (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

BRZOZOWSKI AM, PIKE AC, DAUTER Z, HUBBARD RE, BONN, ENGSTROM O, AHMAN L, GREENE GL, GUSTAFSSON JA, CARLQUIST M (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. **389**:753-758.

BUDA M, KLEIN DC (1978): A suspension culture of pinealocytes: Regulation of N-acetyltransferase activity. *Endocrinology* **103**:1483-1492.

CALZADILLA CH, ABREU P, ALONSO R (1987): Avances en el estudio de la función neural: determinación de catecolaminas y compuestos relacionados en muestras biológicas. *Quim. Clin.*, 41-48.

CARDINALI DP, NAGLE CA, ROSNER JM (1974): Effects of estradiol on melatonin and protein synthesis in the rat pineal organ. *Hormone Research.* **5**:304-310.

CARDINALI DP, NAGLE CA, ROSNER JM (1975): Gonadal steroids as modulators of the function of the pineal gland. *General and Comparative Endocrinology* **26**:50-58.

CARDINALI DP (1977): Nuclear receptor estrogen complex in the rat pineal gland. Modulation by sympathetic nerves. *Neuroendocrinology* **24**:333-346.

CARTER DA (1993): Up-regulation of β_1 -adrenoreceptor messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland: nocturnally through a β -adrenoreceptor-linked mechanism, and in vitro through a novel posttranscriptional mechanism activated by specific protein synthesis inhibitors. *Endocrinology* **133**:2263-2268.

CEÑA V, HALPERIN JI, YEANDLE S, KLEIN DC (1991): Norepinephrine stimulates potassium efflux from pinealocytes: evidence for involvement of biochemical "AND" gate operate by calcium and adenosine 3', 5'-monophosphate. *Endocrinology* **128**:559-569.

CHEN TL, LIU F, BATES RL, HINTZ RL. (1991): Further characterization of insulin-like-growth factor binding proteins in rat osteoblast-like cell cultures: modulation by 17beta-estradiol and human growth hormone. *Endocrinology* **128**:2489-2496

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**:156-9.

CONNELY OM (2001): Perspective: Female steroid hormone Action. *Endocrinology.* **142**: 2194-2199.

COON SL, MCCUNE SK, SUGDEN D, KLEIN DC (1997): Regulation of pineal β -adrenergic receptor mRNA: day / night rhythm and β -adrenergic receptor /cyclic AMP control. *Molecular Pharmacology* **51**:551-557.

CRAFT CM, MORGAN WW, JONES DJ, REITER RY (1985): Hamster and rat pineal gland β -adrenoceptor characterization with Iodocyanopindolol and the effect of decreased catecholamine synthesis on the receptor. *Journal of Pineal Research* **2**: 51-56.

CUTLER GB (1997): The role of estrogen in bone growth and maturation during childhood and adolescence. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **61**:141-4.

DAFNY N (1977): Electrophysiological evidence of photic, acoustic and central input to the pineal body and hypothalamus. *Experimental Neurology* **55**:449-457.

DAFNY N (1980): Two photic pathways contribute to pineal evoked responses. *Life Sciences* **26**:737-742.

DAVIS G (1978): The response of adenosine 3', 5'-monophosphate to norepinephrine in the hypothalamus and pineal organ of female rats in proestrus or diestrus. *Endocrinology* **103**:1048-1053.

DAUVOIS S, DANIELIAN PS, WHITE R, PARKER MG (1992): Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **89**: 4037-4041.

DAUVOIS S, WHITE R, PARKER MG (1993): The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmatic shuttling. *Journal of Cell Science* **106**: 1377-1388.

DE FRANCO DB, QI M, BORROR KC, GARABEDIAN MJ, BRAUTIGAN DL (1991): Protein phosphatase types 1 and/or 2^a regulate nucleocytoplasmic shuttling of glucocorticoid receptors. *Mol. Endocrinol.* **5**: 1215-1228.

DÍAZ M (1999). Modulation of Maxi Cl-channels by oestrogens and antioestrogens. *Journal of Physiology.* **517P**:7S.

LOCK H, DÍAZ M, HARDY SP, VALVERDE MA (2001). Protein phosphatase 2A-dependent activation of maxi Cl-channels by triphenylethylene antioestrogens in C1300 neuroblastoma cells. *Journal of Physiology*. In press.

DLUZEN DE, RAMIREZ VD (1989): Progesterone effects upon dopamine release from the corpus striatum of female rats II. Evidence for a membrane site of action and the role of albumin. *Brain Research* **476**: 378-344.

DLUZEN DE, RAMIREZ VD (1990): In vitro progesterone modulation of amphetamine-stimulated dopamine release from the corpus striatum of ovariectomized estrogen-treated female rats: response characteristics. *Brain Research* **517**:117-112.

ERANKO O, RECHART L, ERANKO L, CUNNINGHAM A (1970): Light and electron microscopic histochemical observations on cholinesterase-containing sympathetic nerve fibers in the pineal body of the rat. *Histochemical Journal* **2**:49.

ETGEN AM, PETITTI N (1986): Norepinephrine-stimulated cyclic AMP accumulation in rat hypothalamic slices: effects of estrous cycle and ovarian steroids. *Brain Research* **375**:385-390.

ETGEN AM, PETITTI N (1987): Mediation of norepinephrine-stimulated cyclic AMP accumulation by adrenergic receptors in hypothalamic and preoptic area slices: effects of estradiol. *Journal of Neurochemistry* **49**:1732-1739.

ETGEN AM, UNGAR S, PETITTI N (1992): Estradiol and progesterone modulation of norepinephrine neurotransmission: implications for the regulation of the female reproductive behavior. *Journal of Neuroendocrinology* **4**:255-271.

FAJARDO N, ABREU P, ALONSO R (1992): Kinetic properties of N-acetyltransferase in bovine pineal gland by using HPLC with fluorimetric detection. *Journal of Pineal Research* **13**:80-84.

FAVIT A, FIORE L, NICOLETTI F, CANONICO PL (1991): Estrogen modulates stimulation of inositol phospholipid hydrolysis by norepinephrine in rat brain slices. *Brain Research* **555**:65-69.

FISKE VM, POUND J, PUTNAM J (1962): Effect of light on the weight of the pineal organ in hypophysectomized, gonadectomized, adrenalectomized or thioracil-fed rats. *Endocrinology* **71**:130-133.

FREEMAN ME (1994): The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In Neill EKJD (ed): *"The Physiology of Reproduction."* New York: Raven Press: 613-658.

GARCÍA-SEGURA LM, CHOWEN JA, PÁRDUZ A, NAFTOLIN F (1994): Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanism. *Progr. Neurobiol.* **44**:279-307.

GASTEL JA, ROSENBOOM PH, RINALDI P, WELLER JL, KLEIN DC (1998): Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* **279**:1358-1360.

GAUER F, CRAFT CM (1996): Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Research* **737**:99-109.

GEE KW, BOLGER MB, BRINTON RE, COIRINI H, MCEWEN B (1988): Steroid regulation of the chloride ionophore in rat brain: structure activity requirements, regional dependence and mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**:346-353.

GIBBS RA (1990): DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal. Chem.* **62**: 1202-1214.

GONZÁLEZ-BRITO A, JONES DJ, ADEME RM, REITER RJ (1988): Characterization and measurement of [125I]-iodopindol binding in individual rat pineal glands: existence of a 24-h rhythm in b-adrenergic receptor density. *Brain Research* **738**:108-114.

GOVITRAPONG P, HAMA Y, PFEIFFER R, EBADI M (1989): Status of dopamine in bovine pineal glands and the stimulation of N-acetyltransferase activity by D2-dopaminergic receptor agonists in the rat pineal glands in culture. *Journal Pineal Research* **6**: 17-31

GRADISHAR WJ, V.C J (1997): Clinical potential of new antiestrogens. *J.Clin Oncol.* **15**:840-852.

GRESE TA, DODGE JA (1996): Estrogen receptors modulators: effects in non-traditional target genes. In J.A B (ed): "Annual Reports in Medical Chemistry." Academic Press NY, pp 181-190.

GRESE TA, SLUKA JP, BRYANT HU, CULLINAN GJ, GLASEBROOK AL, JONES CD, MATSUMOTO K, PALKOWITZ AD, SATO M, TERMINE JD, WINTER MA, YANG NN, DODGE JA (1997): Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators. *Pharmacology* **94**:14105-14110.

GU Q, MOSS RL (1998): Novel mechanism for non-genomic action of 17 β -estradiol on kainate-induced currents in isolated rat CA1 hippocampal neurons. *J.Physiol.* **506**:745-754.

GUERILLOT C, PFISTER A, MULLER J, LAGE D (1982): Recherche de l' origine des fibres nerveuses extraorthosympathiques innervat l'epiphyse du rat (etude du transport retrograde de la peroxydase de raifort). *Reprod Nutr Dev* **22**:371-378.

GUIOCHON-MANTEL A, LESCOP P, CHRISTIN-MAITRE S, LOOSFELT H, PERROT-APPLANAT M, MILGROM E (1991): Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J.* **10**: 3851-3859.

GUPTA TD (1968): Cellular hypertrophy in rat pineals after castration. *Journal of Endocrinology* **41**:607.

HAGA T, HAGA K, KAMEYAMA K (1994): G protein -coupled receptor kinases. *Journal of Neurochemistry* **63**:400-412.

HAJEK RA, ROBERTSON AD, JOHNSTON DA, VAN NT, TCHOLAKIAN RK, WAGNER LA, CONTI CJ, MEISTRICH ML, CONTRERAS N, EDWARDS CL, JONES LA (1997): During development, 17 α -estradiol is a potent estrogen and carcinogen. *Environ Health Perspect.* **105**:577-81.

- HARRELSON A, MCEWEN B (1987): Gonadal steroid modulation of neurotransmitter-stimulated cAMP accumulation in the hippocampus of the rat. *Brain Research* **295**:127-136.
- HAWKINS MB, THORNTON JW, CREWS D, SKIPPER J K, DOTTE A, THOMAS P (2000): Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *PNAS* **97**: 10751-10756.
- HAYASHI T, ISHIKAWA T, YAMADA K, KUZUYA M, NAITO M, HIDAKA H, IGUCHI A (1994): Biphasic effect of estrogen on neuronal constitutive nitric oxide synthase via Ca(2+)-calmodulin dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* **203**:1013-1019.
- HEIN L, KOBILKA BK (1995): Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology* **34**:357-366.
- HERNÁNDEZ A, MARTIN-VASALLO P, TORRES A, SALIDO E (1994): Análisis de RNA: estudio de la expresión génica. *Nefrología*, **XIV**: 145-162.
- HERNÁNDEZ DÍAZ F (1999): Modulación por esteroides sexuales de los mecanismos de transducción neuroendocrina en pinealocitos de rata hembra. Tesis Doctoral. Dep. de Fisiología. Fac. de Medicina. Univ. de La Laguna.
- HERNÁNDEZ FJ, SÁNCHEZ JJ, ABREU P, LÓPEZ-COVIELLA, TABARES L, PRIETO L, ALONSO R (2001): Estrogen modulates α_1/β -adrenoceptor-induced signaling and melatonin production in female rat pinealocytes. *Neuroendocrinology* **73**: 111-122.
- HO AK, KLEIN DC (1987): Phosphatidylinositol phosphodiesterase (Phospholipase C) activity in the pineal gland: characterization and photoneural regulation. *Journal of Neurochemistry* **48**:1033-1038.
- HO AK, CHIK CL, KLEIN DC (1988): Permissive role of calcium in α_1 -adrenergic stimulation of pineal phosphatidylinositol phosphodiesterase (Phospholipase C) activity. *Journal of Pineal Research* **5**:553-564.
- HO AK, CHIK CL (1990): Post-receptor mechanism in dual receptors regulation of second messengers in rat pineal gland. *Progress in Comparative Endocrinology*: 139-145.
- HSU SC, QI M, DE FRANCO DB (1992): Cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function. *EMBO J.* **11**: 3457-3468.
- HWANG BH (1982): Fluorescence and electron microscopy study of the tree shrew pineal organ. *Journal of Neural Transmission* **53**:193-212.
- HYDER AM, CHIAPPETTA C, STANCEL GM (1999): Interaction of human estrogen receptors α and β with the same naturally occurring estrogen response elements. *Biochem. Pharm.* **57**: 597-601.
- INNIS MA y GELFAND DH.(1990): Optimization of PCRs. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (ed): "PCR protocols: a guide to methods and applications". Academic Press Inc., San Diego, CA, pp 3-12.

JENSEN EV (1991): Nuclear hormone receptors: Molecular mechanisms, Cellular functions, Clinical abnormalities: "Overview of the nuclear receptor family". ed. M.G. Parker. San Diego: Academic Press, pp 1-13.

JOHNSON LY, VAUGHAN MK, RICHARSON BA, PETTERNBORG LJ, REITER RJ (1982): Variation in pineal melatonin content during de estrous cycle of the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **169**:416-419.

KANG KI, DEVIN J, CADEPOND F, JIBARD N, GUIOCHON-MANTEL A, BAULIEU EE, CATELLI MG (1994): In vivo functional protein-protein interaction: nuclear targeted hsp90 shifts cytoplasmic steroid receptor mutants into the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:340-4.

KARKANIAS GB, PETITTI N, ETGEN AM (1995): Progesterone attenuation of α_1 -adrenergic receptor stimulation of phosphoinositol hydrolysis in hypothalamus of estrogen primed female rats. *Endocrinology* **136**:1993-1999.

KATADA T, GILMAN AG, WATANABE Y, BAUER S, JAKOBS KH (1985): Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppress its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. *Eur. J. Biochem* **151**:431-437.

KAWASAKI ES (1991): *PCR Protocols* : A guide to methods and applications (eds. Innis M.A, Gelfand DH, Sninsky JJ and white, TJ). Academic Press, San Diego, California).

KEMPPAINEN JA, LANE MV, SAR M, WILSON EM (1992): Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **267**: 968-974.

KING TS, STEGER RW, STEINLECHNER S, REITER RJ (1984): Day-night differences in estimates rates of 5-hydroxytryptamine turnover in the rat pineal gland. *Experimental Brain Research* **54**:432-436.

KITAZAWA T, HAMADA E, KITAZAWA K, GAZNABI KM (1997): Non-genomic mechanism of 17β -oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *Journal of Physiology* **499**:497-511.

KLEIN DC, AUERBACH DA, WELLWE JL (1978): Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3', 5'-monophosphate may be signal for "turn off". *Science* **199**:309-311.

KLEIN DC, SUGDEN D, WELLER JL (1983): Postsynaptic α -adrenergic receptors potentiate the β -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:599-603.

KLEIN DC, SCHAAD NL, NAMBOODORI L, YU L, WELLER JL (1992): Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Biochem. Soc. Transact.* **20**: 299-304.

KORF HW, MOLLER M (1984): The innervation of the mammalian pineal gland with especial reference to the central pinealopetal projections. In R.J R (ed): "*Pineal Research Reviews*." New York: Alan R. Liss, pp 41-86.

- KRUG MS y BERBER SL. (1987): First-strand cDNA synthesis primed with oligo(dT). *Meth. enzymol.* **152**: 316-325.
- KUIPER GGJM, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON JA (1996): Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:5925-5930.
- KUIPER GGJM, GUSTAFSSON JA (1997): The novel estrogen receptor beta-subtype: potential role in the cell- and promoter- specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Letters* **410**:87-90.
- KUIPER GGJM, CARLSSON BO, GRANDIEM K, ENMARK E, HAGGBLAND J, NILSSON S, GUSTAFSSON JA (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* **138**:863-870.
- KUIPER GGJM, CARLQUIST M, GUSTAFSSON JA (1998a): Estrogen is a male and female hormone. *Science and Medicine* **5**:36-45.
- KUIPER GGJM, SHOGHRUE PJ (1998b): The estrogen receptor β subtype: A novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* **19**:253-286.
- KWOK S y HIGUCHI R (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature*. **339**:237-238.
- LAHOOTI H, THORSEN T, AAKVAAG A (1990): Estradiol increases phosphorylation of the 90 kDa heat shock protein not associated with estradiol receptor in MCF-7 cells in culture. *Mol. Cell Endocrinol.* **74**: 33-43.
- LARANGE AH, RONNEKLEIV OK, KELLY MJ (1994): The potency of μ -opioid hyperpolarization of hypothalamic neurons is rapidly attenuated by 17β -estradiol. *Journal of Neuroscience* **14**:6196-6204.
- LEFKOWITZ RJ (1993): G protein-coupled receptor kinases. *Cell* **74**:409-412.
- LOHSE MJ, BENOVIC JL, CODINA J, CARON M, LFKOWITZ RJ (1990): β -arrestin: a protein that regulates α -adrenergic receptor function. *Science* **248**:1547-1550.
- MACGREGOR JI, JORDAN VC (1998): Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological Reviews* **50**:151-196.
- MARÍN AJ (1995): Estudio de la señal de calcio y las corrientes iónicas en el acoplamiento entre el estímulo y la secreción en las células pineales en la rata: "Departamento de Fisiología Médica y Biofísica." Sevilla: Universidad de Sevilla. Tesis Doctoral.
- MARÍN A, UREÑA J, TABARES L (1996): Intracellular calcium release mediated by noradrenaline and acetylcholine in mammalian pineal cells. *Journal Pineal Research* **21**:15-28.

MCDONNELL DP, CLEMM DL, HERMANN T, GOLDMAN ME, PIKE JW (1995): Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol. Endocrinol* **9**:659-669.

MCDONNELL DP (1998): Definition of the molecular mechanism of action of tissue selective oestrogen-receptor modulators. *Semin. Cancer Biol.* **26**: 327-336

MCEWEN B (1991): Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *TiPS* **12**:141-147.

McINERNEY EM, WEIS KE, SUN J, MOSSELMAN S, KATZENELLENBOGEN BS (1998): Transcription activation by the human estrogen receptor subtype β (ER β) studied with ER β and ER α receptor chimeras. *Endocrinology.* **139**: 4513-4522.

MIZE AL, POISNER AM, ALPER RH (2001): Estrogens act in rat hippocampus and frontal cortex to produce rapid, receptor-mediated decreases in serotonin 5HT(1A) receptor function. *Neuroendocrinology.* **73**: 166-74.

MOLLER M, PUJITO PP, MORGAN KC, BADIU C (1997): Localization and diurnal expression of mRNA encoding the β_1 -adrenoreceptor in the rat pineal gland: an in situ hybridization. *Cell Tissue Research.* **288**:279-284.

MOORE RY (1982): The supraquiasmatic nucleus and the organization of a circadian system. *Trends in Neuroscience.* **5**:404-406.

MOORE RY (1996): Neural control of the pineal gland. *Behavioural Brain Research* **73**:125-130.

MOUJIR F, BORDÓN R, SANTANA C, ABREU P, HERNÁNDEZ G, ALONSO R (1990a): Ovarian steroids block the isoproterenol-induced elevation of pineal melatonin production in the female rat. *Neuroscience Letters* **119**:12-14

MOUJIR F, SÁNCHEZ-FRANCO F, SANTANA C, CACICEDO L, ALONSO R (1990b): Immunoreactive levels of pineal arginine vasopressin change during the rat estrous cycle. *Journal of Pineal Research* **8**:359-366.

NADAL A, ROPERO AB, LARIBI O, MAILLET M, FUENTES E, SORIA B (2000): Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor α and estrogen receptor β . *P.N.A.S.* **97**: 11603-11608.

NADAL A, DÍAZ M, VALVERDE MA (2001): The estrogen trinity: membrane, cytosolic and nuclear effects. *N.I.P.S.* **16**: 251-255.

OGAWA S, INOUE S, WATANABE T, HIROI H, ORIMO A, HOSOI T, OUCHI Y, MURAMATSU M (1998): The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* **243**:122-126.

OKATANI Y, WATANABE K, MORIOCA N, HAYASHI K, SAGARA Y (1997): Nocturnal changes in pineal melatonin synthesis during puberty: relation to estrogen and progesterone levels in female rats. *Journal Pineal Research* **22**:33-41.

- OKATANI HK, WATANABE K, MORIOKA N, SAGARA Y (1998a): Estrogen modulates the nocturnal synthesis of melatonin in peripubertal female rats. *Journal of Pineal Research* **24**:224-229.
- OKATANI Y, HAYASHI K, WATANABE K, MORIOKA N, SAGARA S (1998b): Effect of estrogen on melatonin synthesis in females peripubertal rats. *Journal of Pineal Research* **24**:67-72.
- OYEKAN AO, BOTTING JH. (1990): Pharmacodynamic interaction between oestradiol and adrenaline on intravascular aggregation induced by adenosine diphosphate in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* **306**:148-60.
- OZAKI Y, WURTMAN RJ, ALONSO R, LYNCH H, J (1978): Melatonin secretion decrease during the proestrous stage of the rat estrous cycle. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:531-534.
- PAECH K, WEBB P, KUIPER GGJM, NILSON S, GUSTAFSSON JA, KUSHNER PJ, SCANLAN TS (1997): Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* **277**:1508-1510.
- PANGERL B, PANGERL A, REITER RJ (1990): Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *Journal of Neural Transmission* **81**:17-29.
- PARINI P, ANGELIN B, STAVREUS-EVERS A, FREYSCHUSS B, ERIKSSON H, RUDLING M (2000): Biphasic effects of the natural estrogen 17 β -estradiol on hepatic cholesterol metabolism in intact female rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20**:1817-1823.
- PETTERSSON K, GRANDIEN K, KUIPER GGJM, GUSTAFSSON JA (1997): Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α . *Molecular Endocrinology* . **1997**:1486-1496.
- PETITTI N, ETGEN AM (1991): Protein kinase C and phospholipase C mediate α_1 - and β -adrenoreceptor intercommunication in rat hypothalamic slices. *Journal of Neurochemistry* **56**:628-635.
- PEVET P (1983): Anatomy of the pineal gland of mammals. In Reikn R (ed): "The Pineal Gland." New York: Elsevier, pp 1-75.
- PIPPIG S, ANDEXINGER S, DANIEL K, PUZICHA M, CARONS MG, LEFKOWINTZ RJ, LHOSE MJ (1992): Overexpression of β -arrestin and β -adrenergic receptor kinase augment desensitization of β_2 -adrenergic receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **268**:3201-3208.
- PRANGE-KIEL J, RUNE GM, ZWIRNER M, WALLWIENER D, KIESEL L (2001): Regulation of estrogen receptor alpha and progesterone receptor (isoform A and B) expression in cultured human endometrial cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* **109**:231-7.
- PRESS MF, XU SH, WANG JD, GREENE GL (1989): Subcellular distribution of estrogen receptor and progesterone receptor with and without specific ligand. *Am. J. Pathol.* **135**: 857-864.

REESE JC, AND KATZENELLENBOGEN BS (1992): Examination of the DNA-binding ability of estrogen receptor in whole cells: Implications for hormone-dependent transactivation and the actions of antiestrogens. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4531-4538.

REITER RJ (1986): Pineal melatonin production. Photoperiodic and hormonal influences. In Reiter RJ, M (ed): "*Advances in Pineal Research.*" London: John Libbey Co. Ltd, pp 77-78.

REITER RJ (1991): Pineal Gland: Interface between the photoperiodic environment and endocrine system. *Trends in Endocrinology Metabolism* **2**:13-29.

REY E, HERNÁNDEZ-DÍAZ F, ABREU P, LÓPEZ-COVIELLA I, ALONSO R, TABARES L (1997): Incremento de calcio intracelular mediado por dopamina. *Revista de Neuroendocrinología* **25**:1755.

RIEMER RK, BOTTARI SP, JACOBS MM, GOLDFIEN A, ROBERTS JM (1988): Estrogen reduces beta-adrenoreceptor-mediated cAMP production and the concentration of the guanyl nucleotide-regulatory protein, Gs, in rabbit myometrium. *Molecular Pharmacology* **33**:389-395.

ROGER J, LYNNE RM (1993): Adrenoreceptors and their second messenger systems. *Journal of Neurochemistry* **60**:10-23.

RONNEKLEIV O, MOLLER M (1979): Brain-pineal nervous connections in the rat: A ultrastructural study following habenular lesion. *Experimental Brain Research* **37**:551-562.

ROSEBOOM PH, COON SL, BALER R, MCCUNE SK, WELLER JL, KLEIN DC (1996): Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland *Endocrinology* **137**: 3033-3045

SAHU A, CHAKRABORTY S (1986): Estradiol modulation of pineal gland activity in the wild bandicoot rat, *Bandicota bengalensis*. *Acta Anat.* **125**:1-5.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989): "Molecular cloning: a laboratory manual". Nolan C (ed). New York, Cold spring Harbor.

SANCHEZ JJ (1999): Efecto neuromodulador complejo del estradiol sobre β -adrenoceptores en pinealocitos de rata. Tesis de Licenciatura. Dep. de Biología Animal. Fac. de Biología. Univ. de La Laguna.

SCHAPIRO S, SALAS M (1971): Effects of age, light and sympathetic innervation on electrical activity of the rat pineal gland. *Brain Research* **28**:47-55.

SCHLUMPF M, BRUINNIK A, LICHTENSTEIGER W, CORTES R, PALACIOS JM, PAZOS A (1987): Beta-adrenergic binding sites in fetal rat central nervous system and pineal gland: Their relation to other receptor sites. *Developmental Pharmacology and Therapeutics* **10**:422.

SCHOMERUS S, LAEDTKE E, KORF H (1995): Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochem. Int.* **27**:163-175.

SCHUMACHER M (1990): Rapid membrane effects of steroids hormones: an emergin concept in neuroendocrinology. *TINS* **13**:359-361.

SHUGHRUE PJ, LANE MV, MERHENTHALER I (1997): Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* **388**:507-525.

SIBLEY DR, BENOVIC JL, CARON MG, LEFKOWITZ RJ (1987): Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. *Cell*. **48**: 913-922.

SINGH M, SETALO GJr, GUAN X, FRAIL DE, TORAN-ALLERAND CD (2000): Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor-alpha knock-out mice. *J. Neurosci.* **20**: 1694-700.

SIROTKIN AV, MYLZEK J, VRINCIK JL, BULLA J, HETENYI L (1994): The ability of steroid hormones to control cAMP and cGMP production by human granulosa cells in culture. *Cellular Signalling* **7**:61-65.

SMITH MS, FREEMAN ME, NEILL JD (1975): The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* **96**:219-226.

SNEDECOR GW, COHRAN WG (1980): "*Statistical Methods*". Ames, Iowa State University Press, U.S.A.

SOKAL RR, ROHLF FJ (1979): "Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica" Ed. H. Blume, España.

STEHLE JH, FOULKES NS, MOLINA CA, SIMONNEAUX V, PÉVET P, CORSI-SASSONE P (1993): Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* **365**:314-320.

STEHLE JH (1995): Pineal gene experssion: Dawn in a dark matter. *Journal Pineal Research* **18**:179-190.

SUGDEN D, HO AK, SUGDEN AL, KLEIN DC (1988): Negative feedback mechanisms: evidence that desensitization of pineal α_1 -adrenergic responses involves protein kinase C. *Endocrinology* **123**:1425-1432.

SUGDEN D (1990): Pertussis toxin does not inhibit α_1 -adrenergic potentiation of β -adrenergic stimulation of cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **168**:871-877.

TELLERIA CM, ZHONG L, DEB S, SRIVASTAVA RK, PARK SR, SUGINO N, PARK-SARGE OK, GIBORI G (1998): Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens. *Endocrinology* **139**:2432-2442.

TORA L, GRONEMEYER H, TURCOTTE B, GANB MP, CHAMBON P (1988): The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* **333**:185-188.

- TORA L, WHITE J, BRON C, TASSET D, WEBSTER N, SCHEER E, CHAMBON P (1989): The human estrogen receptor has two independent transcriptional activation functions. *Cell* **59**:477-487.
- TREMBLAY GB, TREMBLAY A, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, LABRIE F, GIGUERE V (1997): Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol. Endocrinol.* **11**:353-65.
- TSAI M, O'MALLEY BW (1994): Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:451-486.
- UNGAR S, MAKMAN MH, MORRIS SA, ETGEN AM (1993): Estrogen uncouples β -adrenergic receptor from the stimulatory guanine nucleotide-binding protein in female rat hypothalamus. *Endocrinology* **133**:2818-2826.
- VACAS MI, LOWESTEIN PR, CARDINALI DP (1979): Characterization of a cytosol progesterone receptor in bovine pineal gland. *Neuroendocrinology* **29**:84-89.
- VALVERDE MA, ROJAS P, AMIGO J, COSMELLI D, ORIO P, BAHAMONDE MI, MANN GE, VERGARAC, LATORRE R (1999): Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *science* **285(5435)**: 1929-31.
- VANECEK J, SUDGEN D, WELLER J, KLEIN DC (1985): Atypical synergistic α_1 - and β_1 -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* **116**:2167-2173.
- VOISIN P, NAMBOODIRI MA, KLEIN DC (1984): Arylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *Journal of Biological Chemistry* **259**:10913-10918.
- WADE CB, ROBINSON S, SHAPIRO RA, DORSA DM (2001): Estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*. **142**: 2336-42.
- WAGNER HR, CRUTCHER KA, DAVIS JN (1979): Chronic estrogen treatment decreases beta-adrenergic responses in rat cerebral cortex. *Brain Res.* **171**:147-5.
- WAKELING AE, BOWLER J (1987): Steroidal pure antioestrogen. *Journal of Endocrinology* **112**:R7-R10.
- WATTERS JJ, CAMPBELL JS, CUNNINGHAM MJ, KREBS EG, DORSA DM (1997): Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* **138**:4030-4033.
- WEBSTER N, GREEN S, JIN JR, CHAMBON P (1988): The hormone-binding domains of the glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* **54**:199-207.
- WEHLING M (1994): Nongenomic actions of steroid hormones. *Trends Endocrinol. Metab* **5**:347-353.

WEIHUA Z, SAJI S, IIVIÄKINEN S, CHENG G, JENSEN EV, WARNER I GUSTAFSSON JA (2000): Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus. *P.N.A.S.* **97**: 5936-5941.

WEILAND N, WISE PM (1987): Estrogen alters the diurnal rhythm of α_1 -adrenergic receptor densities in selected brain regions. *Endocrinology* **121**:1751-1758.

WEILAND N, WISE PM (1989): Diurnal rhythmicity of beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in ovariectomized, ovariectomized estradiol-treated and proestrous rats. *Neuroendocrinology* **50**:655--662.

WEISS B, CRAYTON J (1970): Gonadal hormones as regulators of pineal adenyl cyclase activity. *Endocrinology* **87**:527-532.

WHITE R, LEES JA, NEEDHAM M, HAM J, PARKER M (1987): Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol Endocrinol.*, **1**: 735-744.

WONG M, MOSS R (1990): Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid, 17 β -estradiol, on CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *Brain Research* **543**:148-152.

WURTMAN RJ, AXELROLD J (1974): A 24-hour rhythm in the control of norepinephrine in the pineal and salivary glands of the rat. *Life Science* **5**:665-666.

YIE S, BROWN GM (1995): Effects of sex hormones on the pineal response to isoproterenol and pineal beta-adrenergic receptors. *Neuroendocrinology* **62**:93-100.

Apéndice B

APÉNDICE B

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS REALIZADAS DURANTE EL TRANSCURSO DE LA INVESTIGACIÓN

PUBLICACIONES

ABREU P, LLORENTE E, **SANCHEZ JJ**, GONZALEZ MC (2000). Nitric oxide inhibits tyrosine hydroxylase of rat median eminence. *Life Science*. **67**: 1941-1946.

ALMANSA E, **SANCHEZ JJ**, COZZI S, CASARIEGO M, CEJAS J, DIAZ M (2001). Segmental heterogeneity in the biochemical properties of the Na⁺-K⁺-ATPase along the intestine of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Journal of Comparative Physiology – Part B*. **171**: 557-567.

HERNADEZ-DIAZ F, **SANCHEZ JJ**, ABREU P, ALONSO R (2001)*. La glándula pineal como transductor neuroendocrino. *Endocrinología y Nutrición*. **48**:1-8.

HERNADEZ-DIAZ F, **SANCHEZ JJ**, ABREU P, LOPEZ-COVIELLA I, TABARES L, PRIETO L, ALONSO R (2001)*. Estrogen modulates α/β -Adrenoceptor-induced signaling and melatonin production in female rat pinealocytes. *Neuroendocrinology*. **73**: 111-122.

SANTANA C, MOUJIR F, **SANCHEZ JJ**, REITER R, ABREU P (2001). Role of extracellular calcium on the regulation of melatonin synthesis in the Syrian hamster pineal gland. *Journal Pineal Research*. **31**: 289-294.

ARTICULO EN PREPARACIÓN

SANCHEZ JJ, ABREU P, GONZALEZ T, HERNANDEZ A, GONZALEZ M, REYES R, RODRIGUEZ-BELLO A, ALONSO R (2001)*. Estrogen modulation of adrenoceptor responsiveness in the female rat pineal: differential expression of intracellular estrogen receptors. *En preparación*.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

ALMANSA E, **SANCHEZ JJ**, COZZI S, DIAZ M (2000). Determinantes de la heterogeneidad segmental en la actividad NA⁺-K⁺-ATPasa a lo largo del tracto intestinal de la Dorada (*Sparus arata*). *III Congreso de la Federación Española de Sociedades de Biología Experimental*. 7-9 de Diciembre del 2000. (Alicante).

ALONSO R, HERMANDEZ DIAZ F, ABREU P, LOPEZ-COVIELLA I, DIAZ-CRUZ A.T, MARTIN MORALES J. R, **SANCHEZ JJ**, TABARES L, SALIDO E (1998)*. Oestrogen modulation of adrenérgic transmission. A model for cross-talk between neurotransmitter and hormone-activated receptors. *International Joint Meeting of*

Spanish & British Physiological Societies: 27-29 de Abril de 1998 (Liverpool).
Publicado en: *Journal of Physiology* **509**: 16S

SANCHEZ JJ, ABREU P, ALONSO R (1999)*. Evidencia de un efecto neuromodulador complejo β -adrenoreceptores en pinealocitos de rata hembra. *XXX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas*. 29 de Septiembre al 2 de Octubre de 1999. (Cáceres). Publicado en: *Journal of Physiology and Biochemistry*. **55**: 01 1-205.

SANCHEZ JJ, ABREU P, GONZALEZ T, GONZALEZ M, REYES R, RODRIGUEZ-BELLO A, ALONSO R (2000)*. Efecto neuromodulador de los estrógenos y localización de receptores estrogénicos en pinealocitos de rata hembra. *III Congreso de la Federación Española de Sociedades de Biología Experimental*. 7-9 de Diciembre del 2000. (Alicante).

*Publicaciones y comunicaciones directamente relacionadas con el trabajo objeto de esta Tesis Doctoral.