



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Mecanismos intracelulares involucrados en la liberación de
la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) en
distintas condiciones fisiopatológicas**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Javier Fernández-Solari

Directora de tesis: Dra. Valeria Rettori

Consejero de Estudios: Dr. Dante Paz

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neuroendocrinología, Centro de Estudios
Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET/UBA)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2006

Mecanismos intracelulares involucrados en la liberación de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) en distintas condiciones fisiopatológicas

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue determinar los mecanismos involucrados en la liberación de LHRH en condiciones normales y fisiopatológicas. En primer lugar se estudió la interacción entre los distintos mensajeros inter e intraneuronales involucrados en la liberación del neuropéptido en extractos de hipotálamo medio basal (HMB) incubados *in vitro*, así como los mecanismos desencadenados por LHRH sobre su propia liberación. Distintas concentraciones de LHRH dentro del rango fisiológico pusieron en marcha diferentes vías de transducción de señales que conducen a la inhibición de la liberación de la neurohormona, incluyendo incrementos en la liberación de GABA o inhibición en la liberación de glutamato. En segundo término, se estudió la presencia del sistema endocannabinoide en el hipotálamo y su potencial función moduladora de la liberación de LHRH. Los estudios inmunohistoquímicos mostraron una distribución dispersa de los CB1 en el área preóptica hipotalámica donde se encuentran las neuronas de LHRH. Además, se demostró el efecto inhibitorio de la AEA sobre la liberación de LHRH en extractos de HMB incubados *in vitro*. El efecto inhibitorio fue prevenido por el antagonista selectivo de receptores CB1, el AM251, confirmando que tal efecto es mediado por los receptores centrales del sistema endocannabinoide. Adicionalmente, se demostró el papel del GABA como mediador de los efectos inhibitorios de AEA sobre la liberación de LHRH.

Se ha descrito que la liberación de LHRH se encuentra disminuida en distintas condiciones patológicas como las que tienen lugar durante la exposición al LPS, al etanol y a los cannabinoides. Por lo tanto, el objetivo final de la presente tesis fue estudiar si la

inhibición de la liberación de LHRH producida en respuesta al etanol y al LPS involucra la activación del sistema endocannabinoide. Nuestros resultados indicaron que el sistema endocannabinoide hipotalámico es activado por el etanol y por los agentes inflamatorios, LPS y $TNF\alpha$, conduciendo a la inhibición de la liberación de LHRH.

Palabras Clave: LHRH, hipotálamo, endocannabinoides, LPS, etanol.

Intracellular mechanisms involved in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) release in different pathophysiological conditions

Summary

The aim of the present thesis was to determine the mechanisms involved in LHRH release in normal and pathophysiological conditions. First, we studied the interaction between the intra and inter-neuronal messengers involved in LHRH release from medial basal hypothalamic extracts (MBH) incubated *in vitro*, and also the mechanism triggered by LHRH on its own release. Different concentration of LHRH within physiological range turned on different signal transduction pathways that led to the inhibition of LHRH release involving augmentation in GABA release or inhibition in glutamate release. On the other hand, we studied the presence of the endocannabinoid system in the hypothalamus and its potential modulatory role on LHRH release. Immunohistochemical studies showed a scattered distribution of CB1 receptors in the preoptic hypothalamic area where LHRH neurons are localized. Also, we demonstrated the inhibitory effect of AEA on LHRH release from MBH incubated *in vitro*. The inhibitory effect was prevented by the selective CB1 antagonist, AM251, confirming that such effect is mediated, by the endocannabinoid system. Additionally, we demonstrated the modulatory role of GABA as a mediator of the inhibitory effect of AEA on LHRH release. It was reported that in different pathological conditions, such as during LPS-induced endotoxemia or high levels of ethanol or cannabinoid consumption, LHRH release is diminished. Therefore, the last objective of the present thesis was to study the potential modulatory role of the endocannabinoid system in response to LPS and to ethanol. Our results indicated that the hypothalamic endocannabinoid system is activated by inflammatory agents and by ethanol, leading to the inhibition of LHRH release.

Key Words: LHRH, hypothalamus, endocannabinoids, LPS, ethanol.

Los resultados presentados en esta tesis han sido parcialmente publicados en:

Alcohol inhibits luteinizing hormone-releasing hormone release by activating the endocannabinoid system. **Javier Fernández-Solari**, Camila Scorticati, Claudia Mohn, Andrea De Laurentiis, Silvia Billi, Ana Franchi, Samuel M McCann, and Valeria Rettori. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101:3264-3268.

The inhibitory effect of anandamide on luteinizing hormone-releasing hormone secretion is reversed by estrogen. Camila Scorticati*, **Javier Fernández-Solari***, Andrea De Laurentiis, Claudia Mohn, Juan P Prestifilippo, Mercedes Lasaga, Adriana Seilicovich, Silvia Billi, Ana Franchi, Samuel M McCann, and Valeria Rettori. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101:11891-11896. * Igual contribución.

Participation of the endocannabinoid system in the effect of TNF- α on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone (LHRH). **Javier Fernández-Solari**, Juan Pablo Prestifilippo, Stefan R. Bornstein, Samuel M. McCann, Valeria Rettori. En prensa en Ann. N.Y. Acad. Sci. (2006) vol 1088.

A la Dra Valeria Rettori por abrirme las puertas de su laboratorio en un momento complicado, donde el camino científico parecía cerrárseme. Por permitirme trabajar en un clima de libertad, valorar mis ideas e impulsarme a mejorar mi formación día a día.

Al Dr. Don McCann por permitirme continuar con su línea de investigación sobre los mecanismos de liberación de la LHRH y por compartir conmigo su copioso conocimiento científico.

A mi co-equiper y amigo Juanpi, por estar siempre para darme una mano en lo que sea y por contribuir enormemente a la realización de esta tesis.

A Clau, por enseñarme muchas de las técnicas que utilicé en esta tesis, por darme un lugar importante en el labo desde el primer día que llegué.

A Cami, por pasarme la posta de los endocannabinoides y por hacer mas divertidas las jornadas laborales.

A Andre, por compartir la pasión por el mundo de los endocannabinoides y transmitirme su experiencia con la neuroinmunoendocrinología.

A Caro, por transmitir alegría y buena onda en el labo en todo momento.

Al Dr. Alejandro Lomniczi por sentar las bases que permitieron la realización de esta tesis.

Al Dr. Juan Carlos Elverdin por ser mi cable a tierra, por aconsejarme siempre y por abrirme las puertas de su labo en todo momento.

A la Dra. Silvia Billi, por poner a punto la determinación de la actividad de la AEA sintasa y luego transmitirme como reproducirla.

A la Dra. Ana Franchi por estar siempre dispuesta a responder mis dudas y por abrirme las puertas del CEFyBO.

Al Dr. Dante Paz, por presentarme a Valeria y por ser mi consejero de estudios desde hace muchos años.

A mi amigazo el Dr. Matías Pandolfi por levantarme en los momentos duros, criticarme cuando hiciera falta y por contribuir a mejorar la tesis con sus conocimientos de neuroanatomía.

Al Dr. Claudio Mastronardi por su calidez y por ayudarme en la corrección de la tesis.

A la Dra. Roxana Reynoso por sus mediciones de aminoácidos por HPLC.

A la Dra. Liliana Biancioti por permitirme medir la actividad de PLC en su labo y a María Eugenia por ayudarme de manera eficiente.

A la Dra. Paula Vissio, por su amistad y su paciente contribución en la realización de los estudios de inmunohistoquímica.

Al Dr. Omar Pignataro por su gran aporte en la marcación de nucleótidos cíclicos.

A la Dra. Adriana Seilicovich por permitirme usar el cuarto de radioactivo de su cátedra en los meses de mudanza del CEFyBO.

A Daniel, por su predisposición permanente en todo lo referente al cuidado de los animales.

A Carlitos, por su ayuda en el mantenimiento del labo y por sus mates y tortafritas.

A Maki, por ser mi compañero en la carrera hacia los 20 puntos de cursos de postgrado.

A todos los integrantes del CEFyBO que en mayor o menor medida contribuyeron a la realización de esta tesis.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por permitirme comenzar con mis estudios de postgrado.

Al CONICET por otorgarme la beca que me permitió completar mis estudios de postgrado.

A los hermanos que me dio la vida, la Garza y Marat, por cargarme las pilas en cada uno de nuestros encuentros.

A mis viejos por darme amor durante 33 años y por apoyarme en la decisión de encarar la carrera científica.

A mi abuela por estar siempre para darme una mano, sobre todo cuidando a su bisnieto los días de experimentos largos o de inspiración en la escritura.

Al la Morsa, mi compañero de emociones de toda la vida, mi mejor amigo, mi hermano, simplemente por ser todo eso junto.

A mi mujer, por bancarme en TODO desde hace 10 años. Te mereces un monumento, mi amor. Te amo como el primer día...

A Lucas, la luz de mi vida, mi amor para siempre, mi demoño de Tasmania, el que cuestiona todo, todo el tiempo. Por hacerme ser lo mejor que me pasó en la vida, ser padre...

*A mi mujer y mis
hijos*

| | |
|--------|----------------------------------|
| 3V | tercer ventrículo |
| AA | ácido araquidónico |
| AC | adenilato ciclase |
| AEA | anandamida |
| AH | adenohipófisis |
| AMPc | adenosina monofosfato cíclica |
| CB | receptor de cannabinoides |
| CB1 | receptor de cannabinoides tipo 1 |
| COX | ciclooxigenasa |
| DA | dopamina |
| DAG | diacilglicerol |
| dbGMPc | dibutiril GMPc |
| EM | eminencia media |
| EtOH | etanol |
| FAAH | amido hidrolasa de ácidos grasos |
| FRSK | forskolina |
| FSH | hormona folículo estimulante |
| FSH-RF | factor liberador de FSH |
| GABA | ácido gamma amino butírico |
| GC | guanilato ciclase |
| GMPc | guanosina monofosfato cíclica |

| | |
|------------------|--|
| GnRH | hormona liberadora de gonadotrofinas |
| HMB | hipotálamo medio basal |
| HAH | hemadenohipófisis |
| IBMX | isobutilmetilxantina |
| icv | intracerebroventricular |
| IL | interleuquina |
| LH | hormona luteinizante |
| LHRH | hormona liberadora de hormona luteinizante |
| LPS | lipopolisacárido bacteriano |
| mbAMPc | monobutiril AMPc |
| NA | noradrenalina |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| NO | óxido nítrico |
| NOS | óxido nítrico sintasa |
| NOS _e | NOS endotelial |
| NOS _i | NOS inducible |
| NOS _n | NOS neuronal |
| NP | nitroprusiato de sodio |
| NT | neurotransmisor |
| PBS | buffer fosfato salino |
| PG | prostaglandina |
| PGE ₂ | prostaglandina E ₂ |
| PK | proteína quinasa |

| | |
|------------------|-----------------------------------|
| PKA | proteína quinasa A |
| PKC | proteína quinasa C |
| PLA ₂ | fosfolipasa A ₂ |
| PLC | fosfolipasa C |
| PLD | fosfolipasa D |
| RIA | radioinmuno análisis |
| SNC | sistema nervioso central |
| THC | Δ^9 - tetrahidrocannabinol |
| TNF α | factor de necrosis tumoral alfa |

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 Consideraciones anatómicas | 1 |
| 1.2 La hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) | 3 |
| 1.3 Mecanismos involucrados en la liberación de LHRH | 8 |
| 1.3.1 Neurotransmisores | 8 |
| 1.3.1.1 El ácido γ -aminobutírico (GABA) | 8 |
| 1.3.1.2 El glutamato y el aspartato | 9 |
| 1.3.1.3 Las monoaminas | 9 |
| 1.3.2 Mensajeros intra e intracelulares | 10 |
| 1.3.2.1 El óxido nítrico (NO) | 10 |
| 1.3.2.2 Las prostaglandinas | 12 |
| 1.3.2.3 Los nucleótidos cíclicos | 12 |
| 1.3.2.4 El calcio (Ca^{2+}) | 13 |
| 1.3.3 La liberación de LHRH | 14 |
| 1.4 La hormona luteinizante (LH) | 19 |
| 1.5 Los cannabinoides | 21 |
| 1.5.1 Efectos del THC sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico | 22 |
| 1.6 El sistema endocannabinoide | 23 |
| 1.7 Antecedentes que vinculan al etanol y a los cannabinoides en cuanto a la regulación del eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico | 26 |
| 1.8 Antecedentes que vinculan a los agentes pro-inflamatorios y a los cannabinoides en cuanto a la regulación del eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico | 28 |
| 1.8.1 El lipopolisacárido bacteriano (LPS) | 28 |
| 1.8.2 El factor de necrosis tumoral (TNF- α) | 29 |
| 1.8.3 Efectos de la inflamación sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico | 31 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | |
| 2.1 Hipótesis | 35 |
| 2.2 Objetivo General | 35 |
| 2.3 Objetivos Específicos | 35 |

3. MATERIALES Y MÉTODOS

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 3.1 | Animales | 37 |
| 3.2 | Drogas | 37 |
| 3.3 | Extracción de HMB y experimentos <i>in vitro</i> | 38 |
| 3.4 | Determinación de proteínas | 39 |
| 3.5 | Determinación de LHRH por RIA | 39 |
| 3.5.1 | Marcación de la hormona | 39 |
| 3.5.2 | Metodología de RIA de LHRH | 39 |
| 3.6 | Determinación de AMPc por RIA | 40 |
| 3.7 | Determinación de GMPc por RIA | 41 |
| 3.8 | Determinación de PGE por RIA | 42 |
| 3.9 | Determinación de las concentraciones de GABA y glutamato por HPLC | 43 |
| 3.10 | Determinación de la actividad de enzima óxido nítrico sintasa | 44 |
| 3.11 | Determinación de la actividad de la fosfolipasa C (PLC) | 45 |
| 3.12 | Western blot | 46 |
| 3.13 | Inmunohistoquímica | 47 |
| 3.13.1 | Localización de neuronas y terminales de LHRH en el HMB | 47 |
| 3.13.2 | Localización de CB1 en el HMB | 48 |
| 3.14 | Determinación de β-endorfina por RIA | 48 |
| 3.15 | Extracción de la adenohipófisis y experimentos <i>in vitro</i> | 49 |
| 3.16 | Experimentos <i>in vivo</i> | 49 |
| 3.17 | Protocolo de extracción de sangre a lo largo del tiempo | 50 |
| 3.18 | Determinación de LH por RIA | 51 |
| 3.18.1 | Marcación de la hormona LH | 51 |
| 3.18.2 | Metodología del RIA de LH | 51 |
| 3.19 | Medición de la actividad de AEA sintasa | 52 |
| 3.20 | Evaluación estadística de los resultados | 53 |

4. RESULTADOS

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 4.1 | Mecanismos involucrados en la liberación de LHRH | 54 |
| 4.1.1 | Localización de fibras de LHRH | 54 |
| 4.1.2 | Mediadores de la liberación de LHRH | 55 |
| 4.1.3 | Conclusiones parciales | 61 |

| | |
|---|------------|
| 4.2 Mecanismos de autorregulación de LHRH | 62 |
| 4.2.1 Efecto de LHRH sobre los mediadores de su liberación | 62 |
| 4.2.2 Conclusiones parciales | 68 |
| 4.3 Efectos de AEA sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico | 69 |
| 4.3.1 El sistema endocannabinoide como modulador de la liberación de LHRH | 69 |
| 4.3.1.1 Identificación de los CB1 en el hipotálamo | 69 |
| 4.3.1.2 Efectos de la anandamida sobre la liberación de LHRH | 71 |
| 4.3.3 Efectos de la AEA sobre la liberación de LH | 78 |
| 4.3.4 Conclusiones parciales | 81 |
| 4.4 Efectos del EtOH sobre la liberación LHRH. Participación del sistema endocannabinoide. | 82 |
| 4.4.1 Conclusiones parciales | 85 |
| 4.5 Efectos de TNFα sobre la liberación de LHRH. Participación del sistema endocannabinoide. | 86 |
| 4.5.1 Conclusiones parciales | 89 |
| 5. DISCUSIÓN | |
| 5.1 Mecanismos involucrados en la liberación de LHRH | 90 |
| 5.2 Mecanismos de autorregulación de LHRH | 95 |
| 5.3 Efectos de AEA sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico | 103 |
| 5.4 Efectos del EtOH sobre la liberación LHRH. Participación del sistema endocannabinoide. | 109 |
| 5.5 Efectos de TNFα sobre la liberación de LHRH. Participación del sistema endocannabinoide. | 113 |
| 6. CONCLUSIONES | |
| 6.1 Conclusiones finales | 117 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | |
| | 118 |

1.1 Consideraciones anatómicas:

El **hipotálamo** se localiza en la región anterior del diencefalo que se ubica por debajo del surco hipotálamico y enfrente de los núcleos interpedunculares. Esta estructura puede ser dividida en hipotálamo anterior, medio, lateral y posterior, regiones que a su vez contienen varios núcleos y áreas nucleares. Está relacionado con funciones viscerales autónomas, endócrinas y con el control de la homeostasis. Todas estas funciones a su vez se vinculan con la conducta afectiva y emocional. El **hipotálamo medio basal** de rata está limitado rostralmente por el quiasma óptico, lateralmente por las cintillas ópticas y caudalmente por los cuerpos mamilares, asemejándose en forma a un diamante (Carpenter 1985). La zona ventral del área preóptica hipotalamica contiene la mayor parte de los cuerpos neuronales involucrados en la síntesis de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), que proyectan sus axones hacia la eminencia media (EM). La EM del *tuber cinereum* es la zona que forma el piso del tercer ventrículo (3V). Esta zona no se encuentra claramente delimitada y se confunde anatómicamente con el resto de las estructuras hipotalamicas, sin embargo forma parte de la neurohipófisis. La saliencia ventral del hipotálamo y el receso del 3V forman el infundíbulo. La zona que une al infundíbulo con la EM se denomina tallo o tronco infundibular. La porción rostral al tallo infundibular contiene a la EM anterior y la porción posterior del tallo forma la EM posterior, que se encuentra mas desarrollada en los humanos. La EM representa la zona de integración del SNC con el sistema endocrino. Existen conexiones neurales entre el hipotálamo y el lóbulo posterior de la hipófisis y conexiones vasculares entre dicha estructura nerviosa y el lóbulo anterior. Las ramas arteriolares de las arterias carótidas y del polígono de Willis forman una red de capilares fenestrados que reciben el nombre de plexo primario y se ubican en la superficie ventral del hipotálamo. Las asas capilares penetran también en la EM. Estas drenan hacia los vasos sinusoidales porta-

hipofisarios que transportan la sangre siguiendo la trayectoria del tallo de la hipófisis hasta los capilares de la hipófisis anterior (Millhouse 1979).

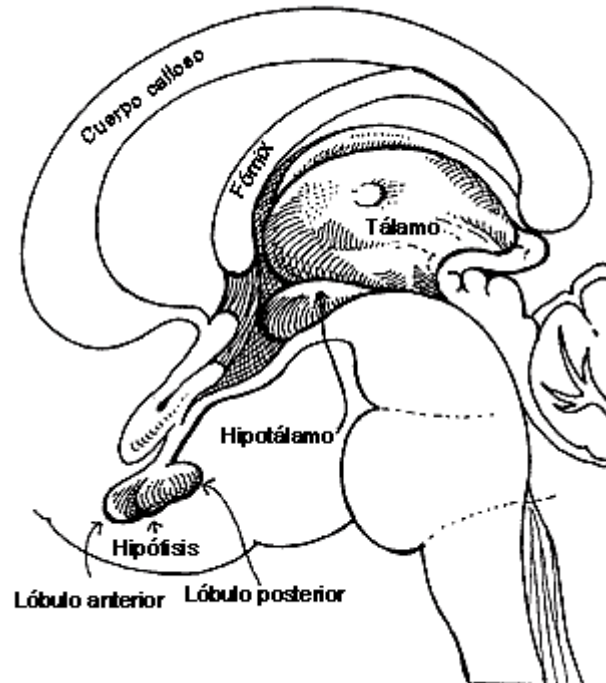


Figura 1. Esquema que representa la posición anatómica del hipotálamo y de la hipófisis en el SNC de mamíferos.

La **hipófisis** se asienta en una depresión del hueso esfenoides denominada silla turca y el tallo hipofisario la une al hipotálamo. La hipófisis consta de dos partes diferentes por su origen embriológico: a) La adenohipófisis, que se origina de una evaginación del estomodeo denominada bolsa de Rathke. Su relación con el hipotálamo está dada por el sistema porta-hipofisario a través del cual los factores reguladores hipotalámicos son conducidos hacia la adenohipófisis. b) La neurohipófisis, que proviene de una evaginación del piso del tercer ventrículo y que se conecta directamente con el hipotálamo por medio de axones nerviosos provenientes de los núcleos supraóptico y paraventricular. Estos axones corren a lo largo del tallo hipofisario y terminan en la pars nervosa de la neurohipófisis (Pickford 1969). La *pars distalis* de la adenohipófisis, sintetiza y libera diferentes hormonas en respuesta a señales

hipotalámicas que actúan sobre órganos blanco desempeñando diferentes funciones. Dentro de este grupo de hormonas se encuentran las gonadotrofinas: la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), que desempeñan funciones reproductivas y que se liberan en respuesta a la estimulación por factores sintetizados principalmente en el hipotálamo conocidos como hormonas liberadoras de gonadotrofinas (Szentagothai y col. 1968).

1.2 La hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH)

En la década del '60, el Dr. Samuel M. McCann junto con sus colaboradores demostró que extractos obtenidos del hipotálamo estimulaban la liberación de LH desde la hipófisis anterior (Taleisnik y McCann 1961). Paralelamente, el Dr. Geoffrey Harris, junto a sus colaboradores, demostró que la microinyección de extractos hipotalámicos en la adenohipofisis de ratas y conejos hembra, inducía la ovulación, indicando que había estimulación de la secreción de LH (Campbell y col. 1964). Estos resultados evidenciaron la actividad liberadora de LH de los extractos hipotalámicos. Si bien, varios laboratorios habían logrado preparaciones altamente puras de la hormona liberadora de LH (LHRH), recién en 1971 el Dr. Matsuo logró determinar la estructura del decapeptido en porcinos, trabajando en el laboratorio del Dr. Schally (Matsuo y col. 1971). Paralelamente, el grupo del Dr. Guillemin presentó la estructura primaria de LHRH proveniente de ovinos (Amoss y col. 1971). Poco tiempo después, se demostró que LHRH también era capaz provocar la liberación adenohipofisaria de FSH, por lo cual muchos autores comenzaron a llamarla hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Cabe destacar, que se ha descrito la presencia de un péptido en el hipotálamo de ratas y cabras, denominado factor liberador de FSH (FSH-RF), análogo a LHRH, que estimula la liberación de FSH de la adenohipofisis sin

modificar la liberación de LH (Wen y col. 1997). De hecho, existen sustancias, como el etanol y el tetrahidrocannabinol, cuya acción a nivel hipotalámico repercute a nivel adenohipofisario inhibiendo la liberación de LH sin tener efecto sobre la liberación de FSH (Dees y col. 1985, Wenger y col. 1987). Actualmente, está bien establecido que el control neuroendocrino de la función reproductiva se expresa a través de la secreción episódica de gonadotrofinas desde la adenohipófisis, en respuesta a la estimulación pulsátil de hormonas liberadoras de gonadotrofinas sintetizadas en neuronas hipotalámicas.

LHRH es sintetizada como una pre-prohormona de 92 aminoácidos, que es clivada en el soma neuronal a una estructura de 10 aminoácidos, y luego es transportada hacia las terminales nerviosas para ser almacenada en gránulos secretorios. El decapeptido maduro se co-secreta con GAP, un péptido de 56 aminoácidos asociado a LHRH, que deriva de la misma pre-prohormona y cuya función no ha sido totalmente dilucidada, aunque se cree que estaría involucrado en la adquisición de la conformación secundaria de LHRH. Actualmente se sabe que LHRH representa el paso inicial de una cascada de eventos que coordinan la fisiología y el comportamiento reproductivo en vertebrados, entre los que se incluyen la estimulación de la síntesis y la liberación de LH y FSH durante la vida reproductiva. Esta neurohormona juega un papel central en la regulación de la función del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal durante el desarrollo fetal y durante la ontogenia. Además, LHRH determina el inicio de la pubertad y es responsable de los cambios producidos durante los ciclos estral, en mamíferos no primates, y menstrual, en mamíferos primates. En la última década se han aislado alrededor de 20 isoformas distintas de LHRH, incluyendo estructuras aisladas en vertebrados y en invertebrados. El cerebro de las distintas especies de vertebrados posee al menos 2 variantes de LHRH, aunque algunas especies de peces perciformes tienen 3 (White y col. 1995, Gothilf y col. 1995). La isoforma predominante en mamíferos tiene la

siguiente secuencia aminoacídica: pGlu-His-Trp-Ser-Tir-Gli-Leu-Arg-Pro-Gli-NH₂ (Parhar 2002). Los somas de las neuronas secretoras de LHRH en la rata se ubican principalmente en el área preóptica hipotalámica (Figura 1 y 2), algunos de ellos formando parte del núcleo arcuato, y emiten sus terminales nerviosas hacia la eminencia media, aunque también se ha identificado la presencia de LHRH en otros órganos como el bulbo olfatorio, la placenta, las gónadas y el riñón. Sus funciones como neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona, entre otras, revelan su importancia como péptido integrador entre sistema nervioso y el sistema endocrino.

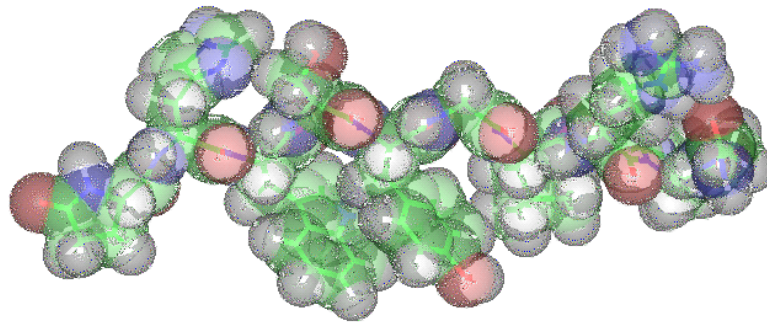


Figura 2. Esquema tridimensional de la estructura molecular de LHRH variante mamífero.

Las neuronas hipotalámicas secretoras de LHRH, a diferencia de otras neuronas, no forman núcleos claramente definidos donde las células estén ubicadas en forma adyacente o estrechamente conectadas. Sin embargo, a pesar de su distribución dispersa, las neuronas están interconectadas funcionalmente formando una red denominada pulso generador de LHRH (Knobil 1980), que es el responsable del patrón sincronizado de liberación del decapeptido hacia el plexo capilar primario en la interfase con los vasos porta hipofisarios.

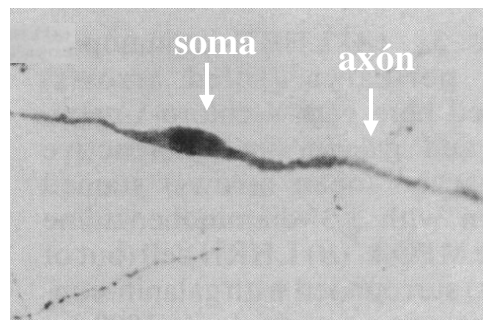


Figura 3. Detalle de una neurona típica de LHRH de rata (250 X). (Proc. Nac. Acad. Sci. 1990, 87: 6326-6330)

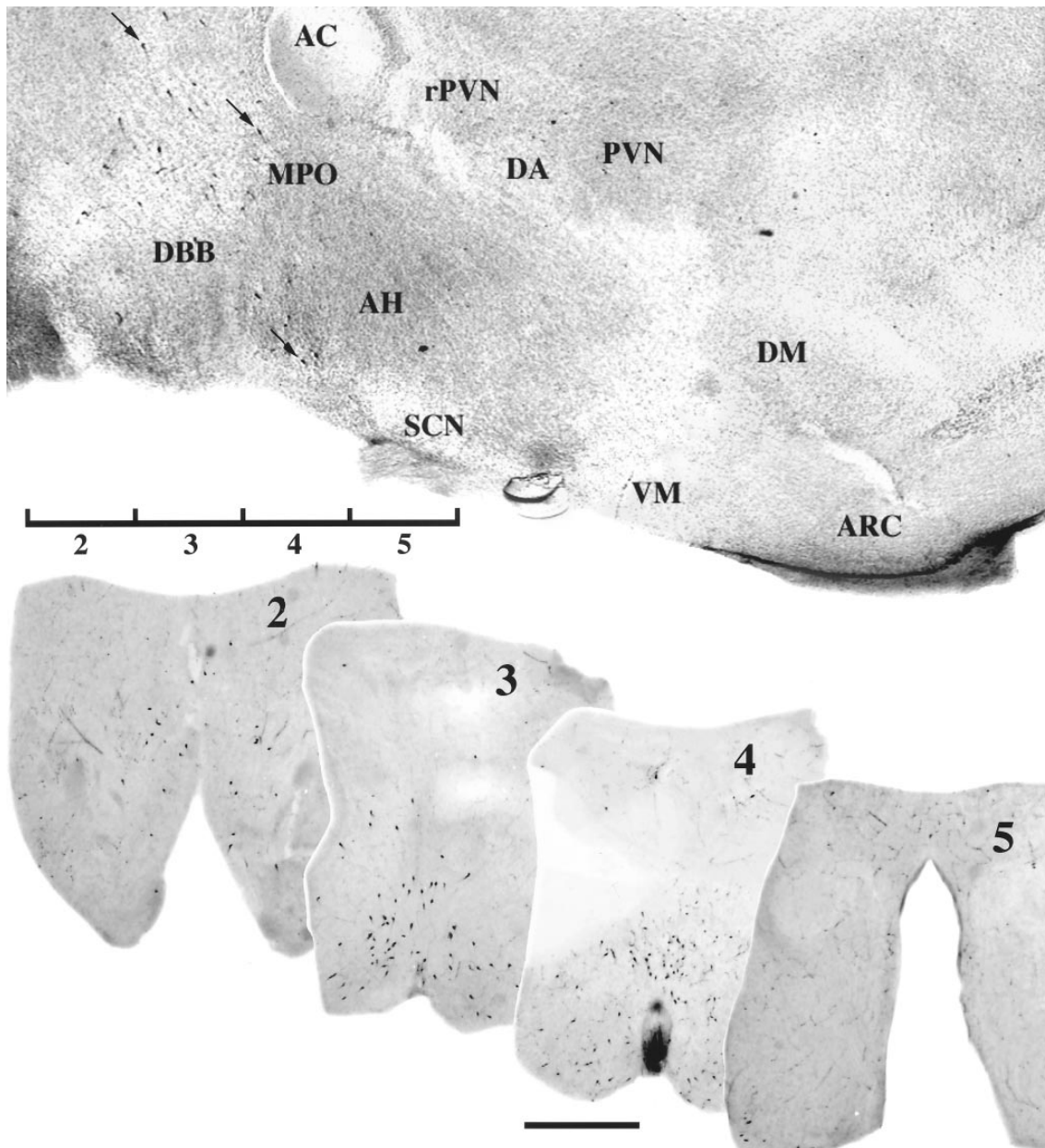


Figura 4. Neuronas de LHRH examinadas en cortes de explantes hipotalámicos. (A) corte parasagital del área preóptica hipotalámica del cerebro de rata. Las flechas indican la localización de neuronas LHRH inmuno-reactivas. (B) Cortes transversales del área preóptica hipotalámica donde se observan neuronas LHRH inmuno-reactivas. Barra de escala: 1000 μ m. AC, comisura anterior; AH, hipotálamo anterior; ARC, núcleo arcuato; DA, área hipotalámica dorsal; DBB, banda diagonal de Broca, DM, núcleo hipotalámico dorsomedial, MPO, área próptica medial; PVN, núcleo paraventricular, rPVN, núcleo paraventricular rostral; SCN, núcleo supraquiasmático, VM, núcleo hipotalámico ventromedial. (J. Neurosci. 1997, 17: 9481-9491)

1.3 Mecanismos involucrados en la liberación de LHRH

En el SNC, la información se transmite a través de la liberación neuronal de neurotransmisores y neuromoduladores que forman parte de mecanismos de sinapsis y de la producción de sustancias químicas que pueden despolarizar o hiperpolarizar membranas celulares o actuar como mensajeros interneuronales. A continuación se introducen las principales moléculas involucradas en la liberación de LHRH.

1.3.1 Neurotransmisores

1.3.1.1 El ácido γ -aminibutírico (GABA)

El **GABA**, es el principal neurotransmisor (NT) inhibitorio del SNC. El sistema de transmisión nerviosa GABAérgico inhibe la actividad neuronal en el SNC a través de la activación de dos tipos de receptores. Los receptores GABA_A son ionotrópicos y comprenden varias subunidades proteicas que forman un canal aniónico sensitivo y un número de sitios regulatorios alostéricos para varias drogas tales como barbitúricos, benzodiazepinas, neuroesteroides y anestésicos. La estimulación de estos receptores produce un incremento en la permeabilidad al ión cloruro, generando la hiperpolarización de la membrana celular (Desarmenien y col. 1983). Los receptores GABA_B son metabotrópicos y se encuentran acoplados a proteínas Gi/Go. Estos receptores responden inhibiendo la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC) o activando la vía de degradación del fosfatidilinositol. Su estimulación conduce al cierre de los canales de Ca²⁺ y a la apertura de los canales de K⁺, lo cual lleva a la disminución de la liberación de neurotransmisores como efecto presináptico y a la hiperpolarización como efecto postsináptico (Kuriyama 1994). Se ha reportado que ambos tipos de receptores se encuentran en el área preóptica hipotalámica y que el GABA

tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de LHRH actuando principalmente sobre los receptores GABA_A en animales adultos (Seilicovich y col. 1995, Leonhardt y col. 1995).

1.3.1.2 El glutamato y el aspartato

El **glutamato** y el **aspartato** son NTs estimulatorios que se producen en las neuronas de núcleos hipotalámicos tales como el arcuato, el supraquiasmático, el supraóptico y el paraventricular, así como en el área preoptica. Los receptores sobre los que actúan estos NTs pueden ser divididos en dos grandes grupos: los ionotrópicos como el de N-metil-D-aspartato (NMDA), el de kainato y el de ácido propiónico-DL- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-lisoxasole (AMPA); y los metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos actúan principalmente por modulación de los canales de Na⁺, K⁺, Ca²⁺, mientras que los metabotrópicos están acoplados a proteínas G y actúan modulando la actividad de la AC (Brann y Mahesh 1994).

El receptor de aminoácidos estimulatorios más importante en el área preóptica donde residen los cuerpos neuronales inmuno-reactivos a LHRH es el de NMDA, mientras que los receptores de AMPA y de kainato parecen actuar principalmente en el núcleo arcuato y en la EM, que es el sitio donde se ubican las terminales nerviosas de LHRH (Lopez y col. 1992, Brann y Mahesh 1994).

1.3.1.3 Las monoaminas

Todas las catecolaminas son sintetizadas a partir de la tirosina circulante que es convertida en el cerebro en dihidrofenilalanina (L-DOPA) por acción de la enzima tirosina hidroxilasa. La L-DOPA es luego descarboxilada a **dopamina** (DA) por la enzima DOPA-descarboxilasa. La **noradrenalina** (NA) es formada a partir de DA por acción de la enzima

dopamina β -hidroxilasa y puede ser metilada a adrenalina por la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) (Fink y col. 1991).

En la EM, la mayoría de las neuronas noradrenérgicas terminan en la capa interna y algunas en la proximidad de la capa externa de los vasos portales. Existen receptores adrenérgicos tipo α_1 y α_2 en la EM, así como también en el núcleo arcuato, que tienen una influencia directa sobre la secreción de LHRH (Negro-Vilar y col. 1979, Rettori y col. 1992).

La DA, al igual que la NA, estimula la secreción de LHRH en explantes de hipotálamo medio basal (HMB) incubados *in vitro*, aunque su mecanismo de acción a nivel hipotalámico aún no ha sido esclarecido (Negro-Vilar 1979 y col., Rettori y col. 1990).

1.3.2 Mensajeros intra e intercelulares

1.3.2.1 El óxido nítrico (NO)

El **NO** es un radical libre reconocido como molécula mensajera intra e intercelular en distintos tejidos. Tiene una vida media de 2 a 7 segundos y como es una molécula difusible no requiere transporte de membrana especial. Es muy inestable químicamente y tiene gran tendencia a reaccionar con el oxígeno y generar radicales derivados del mismo.

El NO se forma a partir de la transformación de L-arginina en L-citrulina y cantidades equimolares de NO por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Kroncke y col. 1995). Existen al menos tres isoformas de esta enzima que fueron clasificadas según el orden o el tejido en el que fueron identificadas (Forstermann y col. 1995). La NOS neuronal o cerebral (NOS_n) se produce constitutivamente en el tejido nervioso y también es denominada de tipo I. La segunda isoforma es la NOS inducible (NOS_i) o de tipo II. Ésta se encuentra principalmente en células del sistema inmune e incrementa su actividad en respuesta a endotoxinas y citoquinas. Finalmente, la NOS endotelial (NOS_e) se produce

constitutivamente en el endotelio vascular y también es denominada de tipo III. Existe un 60% de homología entre la NOSn y la NOSe. Además, estas isoformas son constitutivas y Ca^{2+} -calmodulina dependientes, razón por la cual es necesario un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} para desencadenar su actividad biológica (Robbins y Grisham 1997). La expresión de la NOSi es regulada a nivel transcripcional y la enzima se mantiene unida a la calmodulina a niveles basales de Ca^{2+} intracelular, por lo cual se la considera Ca^{2+} independiente. Posee un 50% de homología con respecto a las otras dos isoformas clásicas (Fostermann y col. 1995). La inducción de la NOSi genera grandes cantidades de NO por periodos prolongados de tiempo, alcanzando concentraciones 1000 veces mayores que las producidas por la NOSn o la NOSe (Kuo y Schroeder 1995).

El mecanismo fisiológico más aceptado para la acción del NO es la activación de una guanilato ciclasa soluble por interacción del oxígeno con el grupo hemo de la enzima, que determina la transformación de GTPc en GDPc. Esta transformación conduce a la disminución de la concentración intracelular de calcio provocando la relajación del músculo liso. Sin embargo, se ha postulado que en el SNC, el NO liberado por neuronas NOérgicas cercanas a las neuronas de LHRH incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} , desencadenando la cascada de señalización que conduce a la liberación del decapeptido (Canteros y col. 1996). De hecho, se ha reportado que el NO tiene un efecto estimulador sobre la liberación de LHRH en HMBs incubados *in vitro* (Rettori y col. 1993 y 1994). Además, se sabe que el NO, incrementa los niveles de GMPc en algunas áreas del cerebro (Bredt y Snyder 1990) y que modula la secreción de varias hormonas hipotalámicas e hipofisarias.

1.3.2.2 Las prostaglandinas

Las prostaglandinas (PGs) constituyen una familia de compuestos derivados de ácidos grasos naturales que están difundidos en todos los sistemas biológicos. Poseen gran versatilidad en cuanto a sus funciones, actuando sobre la presión arterial, la agregación plaquetaria, la quimiotaxis de células sanguíneas, la tonicidad de la musculatura lisa, la luteólisis, la ovulación, la implantación embrionaria, el trabajo de parto y en diversos mecanismos de secreción, modulando efectos hormonales y de neurotransmisores.

Las PGs son pentanos de 20 átomos de carbono que se sintetizan a partir del ácido araquidónico (AA) libre por medio de dos pasos principales (Miyamoto y col. 1976). La primera transformación es catalizada por la enzima ciclooxigenasa (COX) que a partir de AA y oxígeno forma el endoperóxido PGG₂. El siguiente paso es la formación del endoperóxido PGH₂ por medio de una enzima con actividad peroxidasa. Este endoperóxido es el precursor directo de otras prostaglandinas tales como PGE₂, PGD₂ y PGF_{2α}.

Es conocido que las PGs actúan como mensajeros celulares en distintos mecanismos fisiológicos. La PG con mayor influencia sobre la liberación de LHRH es la PGE₂, de hecho, es considerado un mediador clave en la vía de secreción del decapeptido (Rettori y col. 1991).

1.3.2.3 Los nucleótidos cíclicos

La adenosina monofosfato cíclica, conocida como **AMPc**, es formada por acción de la enzima adenilato ciclasa (AC) a partir de ATP. Esta enzima se asocia con distintos tipos de proteínas G para desencadenar la transducción de distintas señales, dependiendo del tipo de receptor al que se encuentre acoplada y del tipo celular en el que se presente. El AMPc es considerado uno de los principales mensajeros intraneuronales involucrados en la liberación

de LHRH (Rettori y col. 1992). Además, el efecto estimulador del AMPc sobre la liberación de LHRH puede ser desencadenado por la activación de receptores hipotalámicos acoplados a AC (Martinez de la Escalera y col. 1992).

La guanosina monofosfato cíclica, conocida como **GMPC**, es formada por acción de la enzima guanilato ciclasa (GC) a partir de GTP. Es un mediador común de respuestas fisiológicas en las que se encuentra involucrado alguno de los dos tipos de GC. Tanto la forma soluble (GCs) como la particulada (GCp) catalizan la síntesis de GMPC.

El GMPC ejerce su acción a través de proteínas kinasas dependientes de él, que provocan la apertura de canales de Ca^{2+} . Entre sus múltiples funciones se encuentra la de modular ciertas señales del AMPc, regulando la actividad de fosfodiesterasas dependientes del nucleótido.

El NO se une al grupo hemo de la GC generando la disociación del Fe^{2+} , lo que produce cambios conformacionales en la enzima que conducen a su activación y al consecuente incremento de la producción de GMPC (Ignarro y col. 1984).

1.3.2.4 El calcio (Ca^{2+})

Es conocido que el Ca^{2+} actúa como segundo mensajero en distintos procesos fisiológicos. Este catión está involucrado en los procesos de exocitosis de diversos tipos celulares. La mayoría de las neuronas requieren un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} para la liberación de NTs desde las terminales presinápticas (Llinas y col. 1992). De hecho, se postula que la naturaleza pulsátil de la liberación de LHRH se encuentra asociada con cambios en la concentración intraneuronal de este catión (Krsmanovic y col. 1992).

1.3.3 La liberación de LHRH

El mecanismo responsable de la generación del pulso de LHRH que determina su secreción episódica en la EM aún no se ha esclarecido. Se ha descrito que las neuronas de LHRH inmortalizadas (Wetsel y col. 1992, Krsmanovic y col. 1992, Martínez de la Escalera y col. 1992), las neuronas de LHRH nativas (Krsmanovic y col. 1999, Terasawa y col. 1999) y los fragmentos hipotalámicos (Rasmussen 1993) estudiados *in vitro*, tienen una capacidad intrínseca de generar neurosecreción pulsátil y que en todos los casos la liberación de LHRH es dependiente de Ca^{2+} y es estimulada por AMPc.

Se han postulado dos niveles de control de la liberación pulsátil de LHRH: 1) el oscilador localizado en las mismas neuronas de LHRH que controla la liberación pulsátil basal y 2) otros tipos celulares conectados directa o indirectamente con las neuronas de LHRH que modifican la liberación basal. Por lo tanto existen varios factores neuroendocrinos que en mayor o menor medida participan en el control de la secreción del decapeptido, incluyendo: endotelina (Krsmanovic y col. 1991), aminoácidos inhibitorios y excitatorios (Lopez y col. 1992, Donoso y col. 1992), agonistas adrenérgicos y dopaminérgicos (Leposavic y col. 1990, Al-Hamood y col. 1987, Jennes y col. 1983), la β -endorfina (Faletti y col. 1999), el neuropéptido Y (Crowley y Kalra 1987), la galanina (Lopez y col. 1990), la sustancia P, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el factor liberador de corticotrofina (CRF) (Ohtsuka y col. 1987 y 1988, Gambacciani y col. 1986) y las hormonas esteroideas gonadales (Karsch y col. 1987, Ojeda y col. 1986), entre otros.

En cuanto a los principales mecanismos intra e intercelulares que intervienen en la liberación de LHRH, se sabe que la NA actúa sobre receptores α_1 -adrenérgicos ubicados en neuronas NOérgicas, provocando el aumento de Ca^{2+} intraneuronal. Este catión se combina con calmodulina para activar la enzima NOSn (Rettori y col. 1992), con el consecuente

aumento de NO que difunde hacia las neuronas de LHRH donde estimula la liberación del decapeptido (Rettori y col. 1993). Además, se sabe que el ácido glutámico, el principal NT estimulador del SNC, actúa al menos en parte, sobre receptores de NMDA ubicados en neuronas noradrenérgicas liberando NA, la cual dispara la cascada de eventos que determinan la liberación de LHRH vía incrementos en la producción de NO (Kamat y col. 1995).

Se ha reportado que el NO difunde hacia las neuronas de LHRH, donde activa la COX con el consecuente incremento de la síntesis de prostanoïdes. La PGE₂ sintetizada incrementa la producción de AMPc por activación de la enzima AC, provocando la exocitosis de los gránulos de LHRH, ya sea por la activación de una proteína quinasa A (PKA) (Ojeda 1979 y col., Canteros y col. 1995) o directamente aumentando la conductancia de canales iónicos, lo cual provoca la despolarización de las membranas neuronales (Vitalis y col. 2000). Algunos autores reportaron que el GMPc, cuya producción es estimulada por la unión del NO al grupo hemo de la enzima GC, tendría un rol importante en la liberación de LHRH, promoviendo la apertura de canales de calcio. La entrada de este catión al espacio intracelular provocaría la despolarización neuronal y la consecuente exocitosis de los gránulos de LHRH (Karanth y col. 2004). En 1979 se reportó la presencia de contacto axo-axónico entre las terminales de LHRH y de DA cercana a los vasos porta-hipofisarios, sugiriendo una influencia de la DA en la liberación de LHRH hacia estos vasos (Ajika 1979). De hecho, posteriormente se demostró que la DA, aunque es considerado un NT inhibitorio en otras regiones del cerebro, estimula la liberación hipotalámica de LHRH (Rotsztein y col. 1977).

También se ha reportado que la ocitocina induce la liberación de LHRH incrementando la actividad noradrenérgica con la consecuente estimulación de la NOSn (Rettori y col. 1997).

La liberación de LHRH no está solo bajo el control de NTs estimulatorios como la NA y el ácido glutámico, sino que además se encuentra bajo el control de NTs inhibitorios como el GABA y la β -endorfina (McCann y Rettori 1986). Se sabe que el GABA es liberado por terminales nerviosas yuxtapuestas con las terminales que contienen los gránulos de LHRH. Este aminoácido actúa principalmente a través de la unión a receptores GABA_A en las neuronas LHRHérgicas, activando canales de cloruro que provocan la hiperpolarización neuronal con la consecuente inhibición de la exocitosis granular en animales adultos. Adicionalmente, se ha descrito la presencia de receptores GABA_B en el hipotálamo, pero su verdadero papel en la liberación de LHRH así como su mecanismo de transducción de señales no ha sido esclarecido (Leonhardt y col. 1995). También se sugiere que el GABA inhibiría la liberación de LHRH bloqueando la respuesta de los axones LHRHérgicos al NO. Sin embargo, se ha reportado que el NO también tendría un efecto estimulatorio sobre la liberación del GABA y que el efecto inhibitorio del amino ácido sobre la liberación de LHRH es bloqueado en presencia de inhibidores de la NOS. Por lo tanto, es probable que el incremento de la liberación de GABA durante la secreción de LHRH inducida por el NO constituya el mecanismo de terminación del pulso (Seilicovich y col. 1995). La β -endorfina, por su parte, es capaz de inhibir la liberación de LHRH a través de la inhibición de la actividad de la NOSn en neuronas NOérgicas vecinas. Adicionalmente, se ha reportado que la β -endorfina estimula la liberación del GABA potenciando aun más el efecto inhibitorio sobre la liberación de LHRH (Faletti y col. 1999).

Adicionalmente, la leptina, una hormona producida principalmente en los adipositos que en la última década ha ganado importancia como factor inductor de la pubertad, estimula la secreción hipotalámica de LHRH incrementando la producción de NO (McCann y col. 1998).

Los receptores de LHRH se localizan principalmente en la hipófisis anterior y en órganos periféricos como gónadas y placenta, aunque también se los ha identificado en el área preóptica hipotalámica. Además, la co-expresión de receptores de LHRH con la propia neurohormona en neuronas hipotalámicas inmortalizadas, así como la capacidad de sus agonistas de modificar su secreción, sugieren la existencia de una regulación autocrina que contribuiría al mecanismo de liberación episódica de LHRH (Krsmanovic y col. 1993 y 1999). Por otro lado, dado que los receptores neuronales de LHRH están asociados con más de una vía de transducción de señales, no debe descartarse la posibilidad de que se disparen mecanismos tanto de activación como de inhibición de la liberación del decapeptido. La estimulación diferencial de las distintas poblaciones de estos receptores podría formar parte del complejo mecanismo de regulación. Existen receptores de LHRH cuya activación desencadena la activación de la enzima fosfolipasa C, que cataliza la degradación del fosfatidilinositol en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) con el consecuente incremento intracelular del Ca²⁺. Otro grupo de receptores de LHRH responde al acoplamiento de ligandos activando la AC, con el consecuente incremento de AMPc (Krsmanovic y col. 2001). Wuttke y col. demostraron que la activación de los receptores hipotalámicos de LHRH desencadenaría respuestas auto-inhedoras, dado que la buserelina, un agonista de receptores de LHRH, disminuyó la liberación del decapeptido desde HMBs incubados *in vitro* (Wuttke y col. 1996). Además, esta disminución fue acompañada por un aumento en la liberación de GABA y una caída en la liberación de glutamato, péptidos

inhibitorio y estimulador de la liberación de LHRH, respectivamente. Esto, a su vez, evidencia que tanto las neuronas GABAérgicas como las glutamatergicas son receptoras a LHRH.

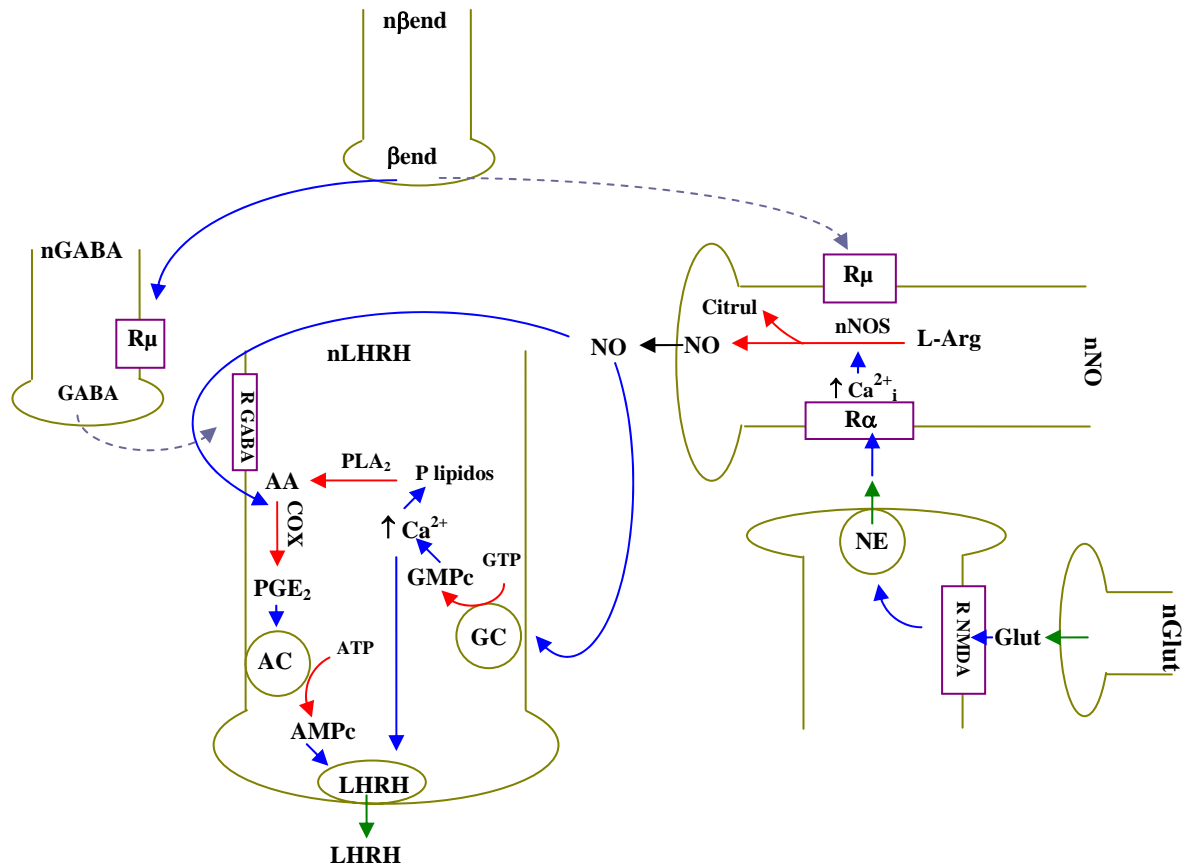


Figura 5. Esquema hipotético que representa los principales mecanismos intra e interneuronales involucrados en la liberación de LHRH. Las flechas azules continúan representan efectos estimuladores, las flechas grises discontinuas representan efectos inhibitorios. R α , receptor alfa-adrenérgico; R μ , receptor opioide; β -end, β -endorfina; PLA₂, fosfolipasa A2; L-Arg, L-arginina; Citrul, citrulina; Glut, glutamato; n-X, neurona de X; r-X, receptor de X; Plipidos, fosfolípidos.

1.4 La hormona luteinizante (LH)

La hormona luteinizante (LH) es una proteína cuya acción principal en machos es la de estimular la síntesis de andrógenos actuando sobre receptores específicos localizados en las células intersticiales o de Leydig testiculares, por lo cual también se la denomina hormona estimulante de células intersticiales (ICSH). Los andrógenos testosterona y dihidrotestosterona (DHT) se encuentran involucrados en la diferenciación de los genitales hacia un fenotipo masculino durante el desarrollo fetal. Además, dirigen la diferenciación y el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios en el adulto.

La LH es sintetizada en los gonadotropos ubicados en la hipófisis anterior y es liberada en respuesta a la acción de LHRH sobre sus receptores específicos. Estos receptores se localizan en la membrana celular de los gonadotropos y muestran una estructura típica de receptores con siete dominios transmembrana (Chi y col. 1993). La vía de transducción de señales desencadenada por la activación de estos receptores involucra la degradación del fosfatidilinositol con la consecuente movilización de calcio y la producción del DAG que culminan con la liberación de LH (Braden y Conn 1991). Además, el DAG activa una proteína quinasa C (PKC) que es la responsable de la transcripción de genes que codifican para la subunidad β de LH.

El tipo de respuesta de los gonadotropos a LHRH depende de la forma en que el decapeptido es administrado. Si la administración es continua, primero hay un aumento dramático de secreción de LH que va disminuyendo con el tiempo. Mientras que si la administración es pulsátil y de frecuencia similar a los pulsos observados en animales castrados (sin retroalimentación negativa por hormonas esteroideas), la secreción de LH se mantiene indefinidamente (Marshall y col. 1981)

El sistema que controla la liberación de gonadotrofinas es similar en el macho y en la hembra, con la salvedad de que en el macho no existe el pico ovulatorio de LH. En ambos sexos la secreción de LHRH es pulsátil. En el macho, los pulsos tienen lugar cada 20-25 minutos. Cada pulso incrementa los niveles de LH por término de 5 a 10 minutos y luego, la secreción de LHRH cesa virtualmente y los niveles de LH declinan hasta hacerse indetectables (Gay y Sheth 1972, Steiner y col. 1982).

La testosterona ejerce una señal de retroalimentación negativa, que en el macho es capaz de modular la secreción de LH, actuando sobre el hipotálamo (Kalra y Kalra 1983, Clayton y col. 1982) y sobre la adenohipófisis (Kingsley y Bogdanove 1973, Giguere y col. 1981), dado que los receptores del andrógeno se localizan en ambas estructuras.

En definitiva, la secreción pulsátil de gonadotrofinas es el resultado de interacciones dinámicas entre los esteroides sexuales, activinas, inhibinas y distintos factores hipotalámicos que actúan sobre la adenohipófisis (Figura 6).

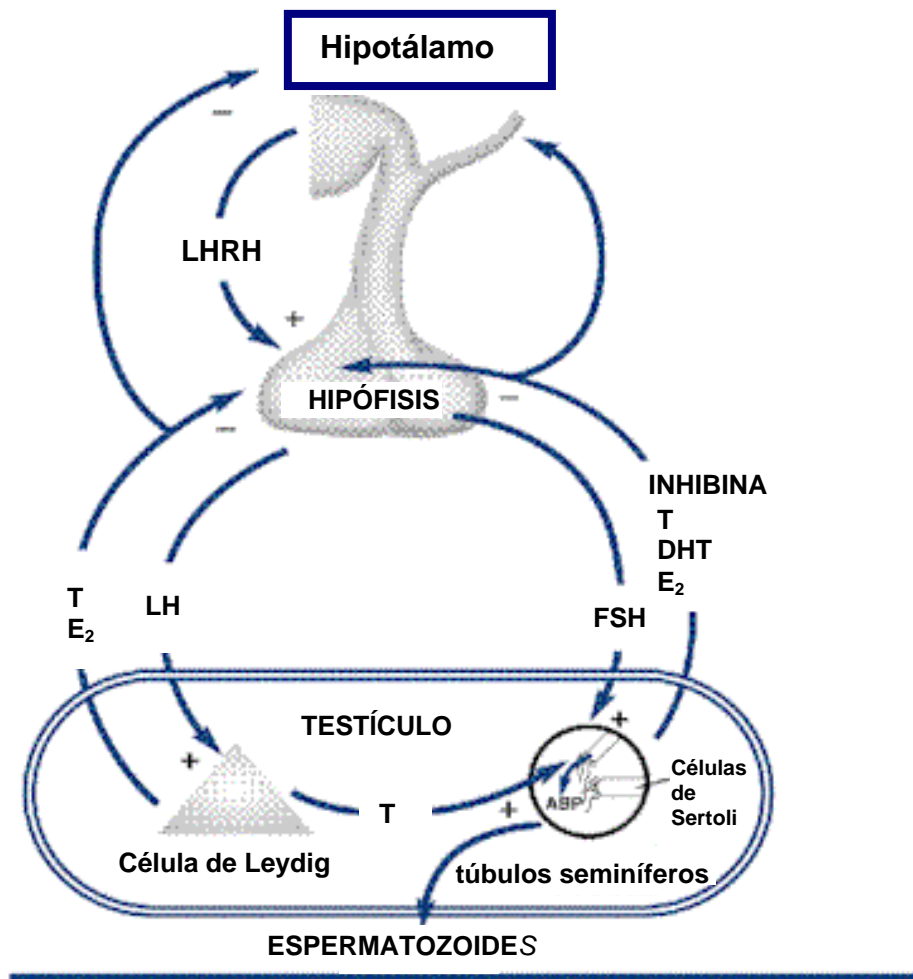


Figura 6. Esquema que representa los mecanismos involucrados en el control del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. T, testosterona; E₂, estradiol; DHT, dihidrotestosterona; ABP, proteína fijadora de andrógenos. Los signos positivos indican efectos estimulatorios y los negativos, efectos inhibitorios.

1.5 Los cannabinoides

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos presentes en la resina de las hojas y brotes florecidos de la planta de marihuana, *Cannabis sativa*. El principal responsable

de las propiedades psicoactivas de la planta es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), aislado por Mechoulam y Gaoni en 1964 (Mechoulam y col. 1965).

1.5.1 Efectos del THC sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico

En cuanto a los efectos neuroendocrinos de la marihuana, se demostró que la administración intracerebroventricular (icv) del THC produce una disminución significativa en los niveles plasmáticos de prolactina, hormona de crecimiento y LH en la rata macho, sin cambios significativos sobre los niveles de FSH (Wenger y col. 1987).

Todos los trabajos publicados en el tema, incluyendo los de nuestro grupo de investigación (Ayalon y col. 1977, Almirez y col. 1983, Wenger y col. 1987), indican que el efecto del THC sobre el eje reproductivo es ejercido principalmente a nivel hipotalámico, donde inhibe la liberación de LHRH con la consecuente disminución de la secreción adenohipofisaria de LH.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación (Rettori y col. 1990) mostraron el THC (10^{-11} a 10^{-8} M) no modificó la liberación basal de LHRH en HMBs incubados *in vitro*. Sin embargo, el THC (10^{-8} M) fue capaz de inhibir la liberación de LHRH estimulada tanto por NA (5×10^{-5} M) como por DA (5×10^{-5} M). Por otro lado, se demostró que la liberación de la PGE_2 , que es estimulada por NA y que además forma parte de la vía secretoria de LHRH, disminuye en presencia de THC. Este efecto es mediado por la inhibición de la COX, ya que se observó una marcada disminución en la actividad de la enzima, medida por la radioconversión de ^{14}C -ácido araquidónico en los diferentes eicosanoides: ^{14}C -6-keto, ^{14}C - $\text{F}_{1\alpha}$, ^{14}C - $\text{PGF}_{2\alpha}$, ^{14}C - PGE_2 y ^{14}C - TxB_2 , luego de incubar explantes de HMB en presencia de THC (10^{-8} y 10^{-7} M) (Rettori 1990 y col.).

Adicionalmente, se ha descrito que el THC, reduce la recaptación de GABA en el globo pálido, resultando en una potenciación del tono GABAérgico (Maneuf y col. 1996). Por lo tanto, el THC podría estar incrementando la actividad GABAérgica hipotalámica durante el proceso de inhibición de la liberación de LHRH.

1.6 El sistema endocannabinoide

Existen evidencias acerca de la existencia de varios tipos de receptores para cannabinoides (CB), pero hasta el momento se han clonado y caracterizado solo dos: el CB1 mayoritariamente expresado en el sistema nervioso (Matsuda y col. 1990) y el CB2 (Munro y col. 1993), principalmente localizado en órganos periféricos, fundamentalmente en células del sistema inmune. Ambos receptores se encuentran acoplados a una proteína $G_{i/o}$ y responden inhibiendo la actividad de la enzima AC (Howlett y Fleming 1984). Además, los CB1 están acoplados a canales iónicos de distinto tipo, característica que no comparten con los CB2. La activación de los CB1 conduce a una regulación negativa de los canales de calcio y positiva de las corrientes rectificadoras de potasio (Pertwee 1997), estando ambos efectos relacionados con la influencia negativa de los agonistas de CB sobre la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso. La identificación de estos receptores de membrana que median los efectos centrales y periféricos de los cannabinoides llevó a los investigadores a buscar ligandos endógenos que los activen. A partir de un extracto lipídico de cerebro de cerdo se aisló la araquidonoiletanolamida (anandamida, AEA), el primer endocannabinoide conocido (Devane y col. 1992). Posteriormente, a partir de un extracto de intestino de perro, se aisló otro ligando endógeno, el 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Mechoulam y col. 1995), que también fue purificado a partir de extractos de cerebro de rata (Sugiura y col. 1995). Los últimos ligandos endógenos identificados fueron el 2-araquidonil gliceril eter (noladin eter),

aislado de cerebro de porcino (Hanus y col. 2001) y la virodhamina, purificada por primera vez de hipocampo humano, cuya característica distintiva es que se comporta como un antagonista endógeno sobre los receptores CB1 (Porter y col. 2002). Todos estos compuestos son derivados del ácido araquidónico y producen efectos similares al THC, especialmente la AEA (Devane y col. 1992, Sugiura y col. 1995, Ameri y col. 1999). También es importante destacar que algunos endocannabinoides como la AEA son capaces de activar los receptores vanilloides (VR1). Estos receptores son canales de cationes involucrados en la captación del dolor, inflamación neurogénica y contracción del músculo liso, cuyo ligando endógeno más conocido es la capsaicina.

Posteriormente, se desarrollaron antagonistas sintéticos selectivos para cada tipo de receptor. Entre los más utilizados en investigación se destacan el AM251 (Gatley y col. 1996), el AM281 (Lan y col. 1999), el SR141716A o Rimonabant (Rinaldi-Carmona 1994 y col. y 1995) y el LY320135 para los CB1 (Felder y col. 1998), y el AM630 (Pertwee y col. 1995) y el SR144528 (Griffin y col. 1999) para los CB2.

Como ocurre con los neurotransmisores clásicos y, en general, con todas las moléculas endógenas neuromoduladoras, los endocannabinoides tienen un sistema específico encargado de su inactivación, que finaliza las respuestas biológicas inducidas por ellos. El sistema de inactivación consta de dos etapas: la primera se denomina etapa de recaptación y está mediada por un transportador específico de membrana, la segunda etapa es la de hidrólisis y está catalizada por la enzima amido-hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Para el caso de la AEA, su transportador específico se denomina ANT, quien la transporta hacia el interior celular donde es hidrolizada por la FAAH en ácido araquidónico y etanolamina, produciendo así la inactivación del endocannabinoide (Figura 7) (Ortega-Gutierrez y col. 2004). Además, se postula que el ácido araquidónico y la etanolamina serían los sustratos para la síntesis *de*

novo de AEA a través de una transformación enzimática que sigue el camino inverso de la degradación. Lo que aún no se ha sido esclarecido es si es una única enzima la que cataliza la síntesis y la degradación, o si son dos enzimas diferentes. Por otro lado se ha reportado que la AEA puede ser producida por el clivaje de un precursor fosfolipídico, el N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE), que se encuentra anclado a la membrana plasmática, por acción de una fosfodiesterasa tipo D (la fosfolipasa D) (Cadas y col. 1996). Esta transformación es inespecífica ya que además de la AEA se producen otras N-aciletanolaminas.

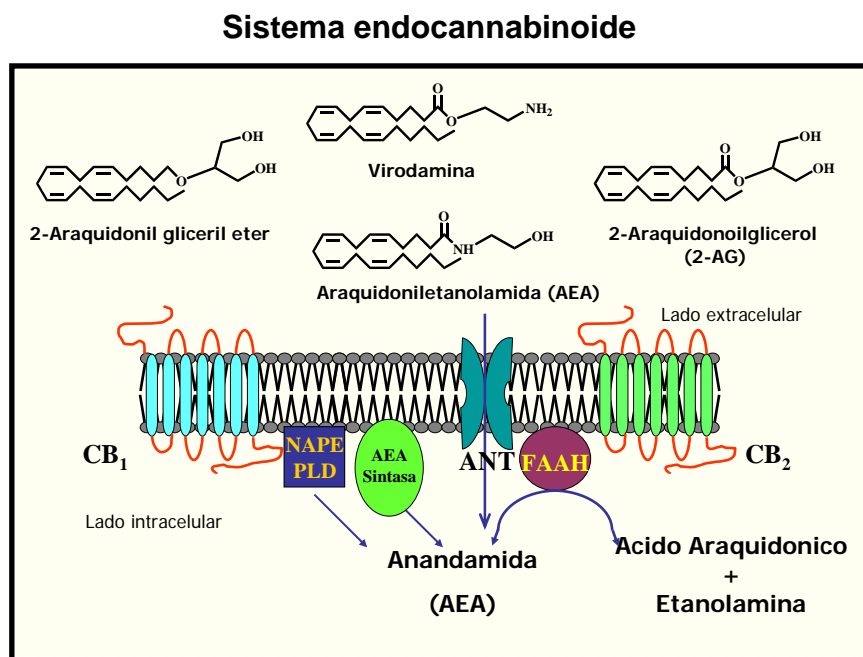


Figura 7. Esquema que muestra la estructura molecular de los principales ligandos endógenos del sistema endocannabinoide, sus receptores CB₁ y CB₂, las enzimas NAPE-PLD y AEA sintasa, y el sistema de inactivación de la señal biológica de AEA, compuesto por su transportador, el ANT y la enzima que cataliza su transformación a ácido araquidónico y etanolamina, la FAAH.

Todas estas observaciones proporcionaron evidencia acerca de la existencia de un sistema cannabinoide endógeno cuyo papel fisiológico está siendo investigado en la actualidad. En el presente trabajo de tesis se estudian algunos mecanismos desencadenados por los endocannabinoides sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico. Respecto a sus otras funciones, puede decirse que el sistema endocannabinoide desempeña un papel modulador de diferentes procesos fisiológicos, principalmente en el cerebro, aunque también en los sistemas inmune y cardiovascular, y de forma menos clara a nivel del metabolismo energético y endocrino. En el cerebro, los endocannabinoides participan en la regulación de la actividad motora (Fernandez-Ruiz y col. 2002), del aprendizaje y la memoria (Lichtman y col. 2002), y de la nocicepción (Rice y col. 2002), así como también desempeñan un papel notable durante el desarrollo cerebral (Fride 2002).

En resumen, los endocannabinoides ejercen fuertes efectos sobre distintos blancos fisiológicos entre los que se encuentra el eje reproductivo. Por lo tanto estos compuestos endógenos desencadenan efectos a nivel hipotalámico, hipofisario y gonadal.

1.7 Antecedentes que vinculan al etanol (EtOH) y a los cannabinoides en cuanto a la regulación del eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico

Es bien conocido el efecto depresor del EtOH sobre el SNC. El EtOH aumenta la sensibilidad benzodiazepínica-GABAérgica y por otro lado aumenta los niveles hipotalámicos de GABA y β -endorfina (Rettori y col. 2002). Hasta el momento, no se han identificado receptores específicos para el alcohol que medien sus efectos. Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que el EtOH inhibe la liberación hipotalámica de LHRH a través del incremento de la liberación de β -endorfina (Lomniczi y col. 2000). A su vez la β -endorfina es capaz de inhibir la liberación de LHRH al menos en dos puntos de su

cascada. En primer lugar, inhibiendo la estimulación NOérgica de la ciclooxigenasa y en segundo lugar estimulando la liberación del GABA. Por otra parte, el consumo de EtOH, al igual que el de cannabinoides, produce alteraciones motoras y de la memoria. Además, se ha descrito la existencia de tolerancia cruzada entre el THC y el EtOH. Ambas drogas poseen características comunes en cuanto a su farmacología: a dosis bajas producen euforia y estimulación, mientras que a dosis altas tienen efectos sedantes. En los últimos años se ha profundizado en el estudio de la implicancia del sistema endocannabinoide como mediador de los efectos del alcohol. En estudios *in vitro* con cultivos celulares de neuroblastoma se demostró que la exposición crónica al EtOH da lugar a un incremento en la producción de AEA (Basavarajappa y Hungund 1999). Además cuando las células se incubaron con EtOH y SR141716A, un antagonista selectivo de CB1, no se observaron variaciones en la producción de AEA, sugiriendo la participación de los CB1 en el aumento de los niveles de endocannabinoides inducido por EtOH. La modificación en los niveles de endocannabinoides tras el consumo de EtOH se observó también *in vivo*. De hecho, se ha descrito que tratamientos con EtOH incrementaron el contenido de AEA en el sistema límbico anterior y disminuyeron el contenido de AEA y 2-AG en el mesencéfalo (González y col. 2002). Este conjunto de resultados experimentales sugiere que la disminución en la densidad de los CB1 que se produce después de un tratamiento crónico con EtOH puede deberse a una sobreestimulación de los receptores a través de un incremento de la síntesis de AEA. Sin embargo, no se descarta que el EtOH altere la densidad y/o la función del receptor debido a un efecto directo sobre los lípidos de membrana.

En ratones, la exposición crónica al EtOH disminuye el número de CB1 sin producir cambios en la afinidad de los receptores (Basavarajappa y col. 1998). El efecto crónico del EtOH también afecta la funcionalidad de estos receptores. De hecho, en membranas de

cerebro de ratones alcoholizados crónicamente, se observó una disminución de la unión de GTP a la subunidad α de la proteína G de los receptores CB1 inducida por el agonista CP55,940, con respecto a ratones control (Basavarajappa y Hungund 1999b). El descenso en el número de uniones GTP-G α genera una caída en la amplitud de las señales transducidas por los receptores. Esta disminución es similar a la que se produce después de un tratamiento crónico con THC, CP55,540 y AEA. Por todo lo descrito anteriormente, y teniendo en cuenta que tanto el EtOH como el THC incrementan el tono GABAérgico en distintas áreas del cerebro (Lomniczi y col. 2000, Maneuf y col. 1996), existe la posibilidad de que el EtOH atenúe la liberación hipotalámica de LHRH actuando al menos en parte a través del sistema endocannabinoide.

1.8 Antecedentes que vinculan a los agentes pro-inflamatorias y a los cannabinoides en cuanto a la regulación del eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico

1.8.1 El lipopolisacárido bacteriano (LPS)

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) es una endotoxina que forma parte de la membrana celular de las bacterias Gram-negativas. Es una molécula anfipática, en la que se distinguen dos grandes áreas, una formada por polisacáridos y otra por lípidos. La porción lipídica, el lípido A, es la porción más uniforme en cuanto a composición química, y la que posee mayor poder endotóxico. El LPS es liberado desde las bacterias Gram-negativas sólo o unido a una proteína externa de la membrana, la proteína A (Rietschel y col. 1996). Ejerce sus efectos por unión del lípido A a la CD14, una glicoproteína anclada a la porción externa de la membrana plasmática. La CD14 está presente en diversos tipos celulares como las células mieloides, monocitos, macrófagos, células de Kupffer, microglía y astrogliá

(Rietschel 1996 y col., Harbrecht y col. 1995). Sin embargo la iniciación de la transducción de las señales desencadenadas por el LPS es mediada por un grupo de factores proteicos trans-membrana que actúan como “receptores símil control de acceso” (toll-like-receptors, Tlr), que se asocian al complejo LPS-CD14 para desencadenar la respuesta. El Tlr4, así como otras 8 moléculas de estructura similar son los candidatos principales para desencadenar la respuesta al LPS (Beutler y Poltorak 2000, Plötz y col. 2001).

Los mecanismos celulares involucrados en la respuesta al LPS, luego de la unión a su receptor, no han sido totalmente dilucidados. Sin embargo, se han observado diversos fenómenos como la formación del inositol trifosfato (IP3), la activación de GC, fosfodiesterasas (PDE) y lipooxigenasas, la fosforilación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas) y la ADP ribosilación de proteínas citoplasmáticas (Harbrecht y col. 1995, Buttini y col. 1997).

El LPS es un poderoso inductor de la síntesis y de la liberación de citoquinas no solo desde células inmunes, sino también desde células del SNC y endocrinas (Couturier y col. 1991, Kang y col. 1992, Gabellec y col. 1995, Abraham y col. 1998). Las citoquinas pro-inflamatorias más estudiadas involucradas en la respuesta al LPS son: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina (IL)-1 y la IL-6.

1.8.2 El factor de necrosis tumoral (TNF- α)

La molécula de TNF- α posee 157 aminoácidos y un peso molecular de 17 kDa (Rink y Kirchner 1996). El TNF- α murino se encuentra glicosilado mientras la molécula humana carece de residuos glicosilados. La proteína es expresada originalmente como una proteína integral de membrana de 26 kDa a partir de la cual, por clivaje proteolítico, el TNF- α maduro de 17 kDa es liberado.

Existe una gran variedad de moléculas inductoras de la síntesis de TNF- α tales como el LPS, diversas citoquinas como el interferón gamma (INF- γ), la IL-1, la IL-2 y el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrofagos (GM-CSF), productos virales y bacterianos y diversas drogas como ésteres de forbol, inhibidores de la COX, etc. También, han sido descritas moléculas que inhiben la expresión del TNF- α como las citoquinas INF- β , IL-6 e IL-10, inhibidores de la síntesis de prostaglandinas y de PDEs, y agentes inmunosupresores.

El TNF- α se une a receptores específicos para ejercer su acción. Existen dos tipos de receptores para TNF- α : el TNFR1 de 55 kDa y el TNFR2 de 75 kDa (Ksontini y col. 1998). Si bien ambos tipos de receptores se co-expresan en la mayoría de las células, uno de los tipos es cuantitativamente dominante para cada tipo celular en particular.

El TNF- α fue inicialmente identificado por sus efectos necrosantes y/o antiproliferativos en tumores experimentales (Sugarman y col. 1985). Posteriormente, fueron descubiertos sus efectos proinflamatorios y su participación en una vasta serie de eventos inmunológicos en respuesta a procesos infecciosos, proliferación neoplásica, etc. Además, posee un importante papel como modulador fisiológico de la respuesta inmune, regulando la proliferación y diferenciación de monocitos, macrófagos y linfocitos.

El TNF- α es sintetizado por una gran variedad de órganos endocrinos y neuroendocrinos como el páncreas, el timo (Giroir y Beutler 1992), la glándula adrenal (Ritchie y col. 1996), la hipófisis (Whiteside y col. 1999), los ovarios (Wang y col. 1992), los testículos (Spangelo y col. 1995) y el hipotálamo (Jansky y col. 1995). Además, cumple un papel importante en la respuesta neuroendocrina ante situaciones de infección, inflamación y endotoxemia, ya que es uno de los mediadores centrales involucrados en la respuesta al LPS.

1.8.3 Efectos de la inflamación sobre el eje hipotálamo- hipofisogonadotrófico

La administración del LPS es empleada como modelo para estudiar los mecanismos inmunoneuroendocrinos involucrados en respuesta a la infección, la inflamación y la endotoxemia. Por otro lado, el sistema inmune es regulado por el sistema neuroendocrino y este último a su vez es afectado por el inmune. Subsecuentes observaciones revelaron que la hipófisis juega un papel primordial en el desarrollo del sistema inmune y en el mantenimiento de la función inmune normal (Nagy y Berczi 1978). Desordenes en el sistema inmune generalmente van acompañados de alteraciones en el eje reproductivo. La administración del LPS induce la expresión de los ARNm de TNF- α , IL-1 e IL-6 en la hipófisis, en el hipotálamo y en el hipocampo (Nadeau y Riviest 1999, Jansky y col. 1995, Whiteside y col. 1999). En estos tejidos, la aparición del mensajero de la IL-6 es posterior a la de los ARNm de TNF- α e IL-1 (Layé y col. 1994). Luego de la administración del LPS, la respuesta celular en la hipófisis y en el SNC sigue un patrón temporal similar al de la concentración de estas citoquinas en la circulación general (Yoshimoto y col. 1992), sugiriendo la existencia de mecanismos comunes de respuesta a la infección en el SNC y los órganos periféricos. Como consecuencia de la alteración de parámetros fisiológicos y la activación neuroendocrina, los procesos infecciosos/inflamatorios generan un patrón de secreción hormonal alterado. La mayoría de las acciones del LPS a nivel neuroendocrino parecen ser mediadas por citoquinas, siendo poco probable que el LPS afecte directamente la secreción adenohipofisaria. Situaciones de estrés, infección e inflamación activan el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, mientras que inhiben el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (HHG). Con respecto al HHG, el LPS inhibe la liberación LHRH y de gonadotrofinas. La inhibición de la liberación de LHRH en respuesta al LPS sería consecuencia de la acción conjunta de citoquinas como el TNF- α , la IL-1 y la IL-6. Con respecto a la liberación de LH,

se ha reportado que el TNF- α no afecta la liberación basal mientras que inhibe la liberación estimulada por LHRH (Gaillard y col. 1990).

Además, durante las endotoxemias inducidas por LPS también aumenta la actividad de la NOS a nivel hipotalámico, pero la IL-1 bloquea la liberación de LHRH inducida por el NO (McCann y col. 2000). A nivel de la adenohipófisis, el efecto inhibitorio del LPS sobre la liberación de LH sería, en parte, mediado por la IL-1 liberada desde el SNC (Ebisui y col. 1992). De hecho, la liberación de LH es inhibida por la administración de IL-1 en el SNC (Rivier y Rivest 1993). El TNF- α también participa en la inhibición del pulso generador de LHRH inducido por el LPS, ya que este efecto es revertido parcialmente por la administración de anticuerpos anti TNF- α (Yoo y col. 1997). Por el contrario, la IL-6 estimularía la liberación de LHRH, ya que en experimentos realizados con un antagonista del receptor de IL-6, la IL-6ra, el efecto inhibitorio del LPS sobre la liberación de LHRH se vio potenciado (Feleder y col. 1998). Por otro lado, el LPS estimula la liberación de taurina y GABA desde el hipotálamo, mientras que inhibe la liberación de glutamato (Feleder y col. 1996). A su vez, el TNF- α y la IL-6 afectan la liberación de GABA desde el lóbulo neurointermedio (LNI) y desde el HMB. Dado que estos neurotransmisores intervienen en la regulación de la liberación de LHRH, estos resultados sugieren que tanto el GABA como el glutamato podrían estar involucrados en la respuesta neuroendocrina en situaciones de estrés o inflamación (De Laurentiis y col. 1999).

La presencia de CB1 y CB2, así como la producción de endocannabinoides, en linfocitos y macrófagos ha sugerido que el sistema endocannabinoide opera de manera activa en el sistema inmune. Estudios con animales de experimentación confirmaron que los cannabinoides a dosis elevadas reducen la capacidad de defensa del organismo. Se ha reportado que los cannabinoides pueden suprimir las respuestas proliferativas de los

linfocitos B a la estimulación con LPS. Además, se observó que la AEA inhibe la producción de NO y TNF- α y aumenta la producción de IL-6 en astrocitos de ratón estimulados con LPS (Molina-Holgado y col. 1998).

Con respecto a la conexión entre el sistema inmune y el endocannabinoide, en los últimos años se ha observado un incremento en el número de estudios que examinan los efectos de los endocannabinoides sobre la biología de las citoquinas en distintos sistemas celulares (Klein y col. 2000). La AEA, además de modular la respuesta celular a distintas citoquinas, puede incrementar o disminuir la producción de las mismas en diferentes condiciones experimentales. Por ejemplo, cultivos de astrocitos de corteza cerebral murina, infectados con el virus de encefalomielitis de Theiler, incrementaron la producción de IL-6 en presencia de AEA (Molina-Holgado y col. 1998). Adicionalmente, se realizaron estudios con células mononucleares de sangre periférica humana que demostraron que la AEA puede incrementar o disminuir la liberación de citoquinas dependiendo de la concentración de la droga. Por ejemplo, la liberación de IL-6 e IL-8 disminuyó con bajas concentraciones de AEA, mientras que la de TNF α , el INF γ y la IL-4 disminuyó con altas concentraciones de la droga (Berdyshev y col. 1997). Sin embargo, no se han publicado muchos trabajos acerca del efecto de las citoquinas sobre el sistema endocannabinoide.

Se ha descrito que el LPS activa mecanismos inhibitorios de la liberación de LHRH similares a los descritos para los cannabinoides, principalmente incrementando la actividad GABAérgica (Feleder y col. 1996B). Por lo tanto, es probable que el mecanismo de inhibición de la liberación de LHRH provocado por la administración de LPS involucre, al menos en parte, al sistema endocannabinoide. Este mecanismo podría involucrar incrementos en los niveles de endocannabinoides durante la endotoxemia inducida por LPS. De hecho, se ha reportado que el LPS estimula la síntesis de AEA en macrófagos peritoneales de ratón por

inducción de su síntesis (Liu y col. 2003). Además, se observó un incremento en los niveles de AEA en linfocitos humanos expuestos a LPS (Maccarrone y col. 2001). Teniendo en cuenta los efectos inmunosupresores ejercidos por los endocannabinoides, el incremento en la síntesis de AEA inducido por el LPS podría ser una respuesta fisiológica del organismo para atenuar los efectos nocivos desencadenados durante la inflamación.

LHRH es una hormona clave en el control del comportamiento y la fisiología reproductiva. La frecuencia y magnitud de su liberación desde las terminales nerviosas ubicadas en la eminencia media hacia el plexo primario, en la interfase con los vasos porta-hipofisarios repercute en la síntesis y liberación de gonadotrofinas que a su vez controlan la función gonadal.

2.1 Hipótesis

Existen varios mecanismos involucrados en la liberación de LHRH. A su vez, estos mecanismos son alterados en condiciones fisiopatológicas como las que se desencadenan luego de la administración de cannabinoides, etanol o LPS, afectando la función reproductiva.

2.2 Objetivo General

Estudiar los mecanismos involucrados en la liberación de LHRH en condiciones normales y fisiopatológicas

2.3 Objetivos Específicos

Objetivo 1: Estudiar los mecanismos inter e intraneuronales involucrados en la liberación de LHRH.

Objetivo 2: Estudiar los mecanismos involucrados en la retroalimentación negativa ejercida por LHRH sobre su propia liberación.

Objetivo 3: *Estudiar los efectos del endocannabinoide anandamida (AEA) sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico.*

Objetivo 4: *Determinar si el efecto inhibitorio del etanol (EtOH) sobre la liberación hipotalámica de LHRH involucra la participación del sistema endocannabinoide.*

Objetivo 5: *Determinar si el efecto inhibitorio de la liberación de LHRH desencadenado en condiciones inflamatorias involucra la participación del sistema endocannabinoide.*

3.1 Animales

Se utilizaron ratas macho adultas-jóvenes de la cepa Wistar (220-250 g de peso corporal). Los animales fueron mantenidos con una dieta basada en alimento balanceado y agua *ad libitum*, bajo condiciones controladas de luz (14 horas luz / 10 horas oscuridad) a una temperatura entre 22 y 24°C. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de cuidado de animales del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, y fueron desarrollados de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

3.2 Drogas

LHRH y LH para iodinación fueron obtenidas de Peninsula Laboratories INC Division of Bachem (San Carlos, CA, USA). El ¹²⁵Iodo para iodinación y la ³H-PGE₂ para radioinmunoensayos provinieron de New England NuclearTM Life Science Product (Boston, MA, USA). Naltrexona, bicuculina, LPS, ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), forskolina (FRSK), anandamida, isobutil-metilxantina (IBMX), LHRH, AMPc GMPc, monobutil AMPc. dibutil GMPc, PGE₂ provinieron de Sigma Aldrich, (St. Louis, Mi, USA), AM251 [N-(piperidin-1-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-chlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide] de TocrisTM (Ellisville, MO, USA) Etanol de Merck (Rahway, NJ). TNF α recombinante humano de Promega Corporation (Madison, WI, USA). SQ22536 (Calbiochem, USA). Dowex 50 W-X8 (forma sódica, Bio-Rad Lab., Reino Unido). L-arginina-[U-¹⁴C] (Amersham Corp., Reino Unido), Solvable (DuPont NEN, EE.UU.), líquido de centelleo (Wallac Oy, Fin / Fisher Chemicals, Reino Unido).

3.3 Extracción de los HMBs y experimentos *in vitro*

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, y luego de la extracción de los cerebros, los HMBs, conteniendo a la EM, fueron disecados como se describe a continuación: se realizó un corte frontal por detrás del quiasma óptico, otro corte horizontal detrás de la EM. Luego se realizaron dos cortes longitudinales de aproximadamente 3 mm de longitud, a una distancia lateral de 1.5 mm de la línea media, a ambos lados. Para estos cortes se utilizó una tijera de cirugía oftalmológica (Roboz RS-563 Stainiess Germany). Los HMBs (1/tubo) se incubaron en 500 μ l de Krebs-Ringer (NaCl 124.4 mM, KCl 4.98 mM, CaCl₂ 1.25 mM, KH₂PO₄ 1.25 mM, MgSO₄ 1.42 mM, NaHCO₃ 25 mM) bicarbonato (KRB) / glucosa (5.55 mM) (pH 7.4) conteniendo ácido ascórbico (0.316 mM) y bacitracina (100 μ M) bajo una atmósfera de 95% O₂ / 5% CO₂ con agitación constante de 60 ciclos por min a 37 °C. En todos los casos los explantes fueron preincubados durante 15 min, reemplazándose luego el medio por otro fresco conteniendo los compuestos a estudiar. Luego de cambiar el medio, los HMBs fueron incubados por 30 min adicionales. Los HMBs utilizados como controles se incubaron en buffer solo o conteniendo el disolvente de las drogas utilizadas en las incubaciones de los explantes hipotalámicos tratados. Al finalizar cada incubación los medios fueron transferidos a tubos Eppendorf y congelados a -70 °C hasta el día de la determinación de las sustancias liberadas. Para medir las distintas sustancias contenidas en el tejido, los HMBs fueron tratados como se describe a continuación y guardados a -70 °C hasta el día de las determinaciones.

3.4 Determinación de proteínas

En todos los ensayos en que los resultados fueron expresados por mg de proteína, las mismas fueron determinadas por el método de Bradford (Bradford 1976) a partir de homogenatos de HMB.

3.5 Determinación de LHRH por RIA

3.5.1 Marcación de la hormona

Para la marcación de LHRH se utilizó el método de cloramina T. Se procedió de la siguiente manera: a una alícuota de LHRH (5 µg / 5µl) se le agregaron 25 µl de buffer fosfato 0.5 M pH 7.5. A esta mezcla se le agregó 1 mCi de ¹²⁵I y 10 µl de cloramina T (1 mg / ml en buffer PBS 0.05 M pH 7.5). Se dejó reaccionar 13 segundos en agitación. La reacción se detuvo con 25 µl de metabisulfito de sodio (2.5 mg / ml de buffer 0.05 M pH 7.5). Luego se sembró la mezcla sobre una columna CMC-52, colectando fracciones de 2 ml en tubos que contenían 1 ml de buffer de LHRH. Los primeros 5 tubos fueron eluidos con buffer de acetato de amonio 0.002 M pH 4.5. Luego se cambió por acetato de amonio 0.2 M para todos los tubos siguientes. En los primeros 5 tubos se colectó el ¹²⁵I libre y generalmente la hormona marcada eluye entre los tubos 10-12 . Para la realización de los RIAs se utilizó la hormona marcada alojada en el tubo que mostró mayor cantidad de cuentas.

3.5.2 Metodología del RIA de LHRH

Finalizadas las incubaciones, los medios fueron hervidos durante 10 min, para inactivar las proteasas que degradan LHRH, y conservados a -70 °C. Para la determinación se utilizó un antisuero policlonal anti-LHRH altamente específico que fue donado por la Dra.

Ayala Barnea (Universidad de Texas, South Western Medical Center at Dallas, Tx, USA). Los estándares fueron reconstituidos en buffer LHRH [PBS 0.01 M, NaCl 17 %, gelatina 2 %, merthiolate (timerosal) 20 %, EDTA 18.6 %]. Las fracciones (100 µl) de los estándares y de las muestras fueron incubadas en 100 µl de anisero anti-LHRH durante 3 hs a temperatura ambiente. La dilución de trabajo del antisuero fue determinada a través de un ensayo de unión. Luego del agregado de 100 µl del trazador radioactivo (aprox. 10.000 dpm / 100 µl ¹²⁵I-LHRH) la incubación se continuó por 20 hs a temperatura ambiente. Las formas unidas y libres se separaron con el agregado de 1 ml de etanol absoluto en baño de hielo, agitación intensa y posterior centrifugación durante 30 min a 3000 rpm y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se contó la radioactividad contenida en el pellet. La sensibilidad del ensayo fue de 0.2 pg por tubo y la curva estándar mantiene la linealidad hasta 100 pg / tubo de LHRH. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 7 % y 9 %, respectivamente. Las muestras fueron medidas por duplicado. Los resultados fueron expresados como pg de LHRH / HMB.

3.6 Determinación de AMPc por RIA

Luego de la incubación, los HMBs fueron homogeneizados en 250 µl de agua destilada y se extrajo una alícuota para medir proteínas por el método de Bradford (Bradford 1976). Los homogenatos fueron hervidos durante 3 minutos para evitar la degradación del AMPc por fosfodiesterasas. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 10000 rpm y se separó el sobrenadante, que fue guardado a -70 °C hasta el día de la determinación. Para la determinación se utilizó un antisuero anti-AMPc provisto por el Dr. A. F. Parlow del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (Bethesda).

Los estándares fueron reconstituidos en buffer acetato (50 mM pH 6.2). Las fracciones (100 µl) de los estándares y de las muestras fueron acetiladas con 10 µl de una mezcla de trietilamina: anhídrido acético (2 : 1) e incubadas con 100 µl de anisero anti-AMPc y con 100 µl del trazador (aprox. 25000 cpm / 100 µl de I¹²⁵-AMPc) durante 20 hs a 4 °C. La dilución de trabajo del antisuero fue determinada a través de un ensayo de unión. Las formas unidas y libres se separaron con 100 µl BSA 2 % + 2 ml de etanol absoluto en baño de hielo, agitación intensa y posterior centrifugación durante 15 min a 3000 rpm y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se contó la radioactividad contenida en el pellet. La sensibilidad del ensayo fue de 10 fmoles por tubo y la curva estándar mantiene la linealidad hasta 2.5 pmoles / tubo de AMPc. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 8 y 10 %, respectivamente. Las muestras fueron medidas por duplicado. Los resultados fueron expresados como fmoles de AMPc / mg de proteína.

3.7 Determinación de GMPc por RIA

Luego de la incubación, los HMBs fueron homogeneizados en 250 µl de agua destilada y se extrajo una alícuota para medir proteínas. Luego, los homogenatos fueron hervidos durante 3 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 10.000 rpm y se separó el sobrenadante que fue guardado a -70 °C hasta el día de la determinación. Para la determinación se utilizó un antisuero anti-GMPc de SIGMA. Las muestras y los estándares fueron reconstituidos en buffer acetato (50 mM pH 6.2). Las fracciones (100 µl) de los estándares y de las muestras fueron acetiladas con 20 µl de una mezcla de trietilamina: anhídrido acético (2 : 1) e incubadas con 100 µl de anisero anti-GMPc más 750 µl adicionales de buffer acetato durante 4 hs a 4 °C. Culminada la primera incubación y luego

del agregado de 100 μ l del trazador radioactivo (aprox. 10000 cpm / 100 μ l de ^{125}I -GMPC) se procedió a incubar nuevamente durante 18 hs a 4 °C. Las formas unidas y libres se separaron con 100 μ l BSA 2 % + 2 ml de etanol absoluto en baño de hielo, agitación intensa y posterior centrifugación durante 15 min a 3000 rpm y a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se contó la radioactividad contenida en el pellet. La sensibilidad del ensayo fue de 24 fmoles por tubo y la curva estándar mantiene la linealidad hasta 25 pmoles / tubo de GMPC. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 8 y 10 %, respectivamente. Las muestras fueron medidas por duplicado. Los resultados fueron expresados como pmoles de GMPC / mg de proteína.

3.8 Determinación de PGE por RIA

Para extraer la PGE contenida en el tejido, los HMBs fueron homogeneizados en 1 ml de etanol frío y centrifugados durante 10 min a 10000 rpm. Se extrajo el sobrenadante y se repitió el procedimiento anterior agregando 1 ml de etanol al pellet. El volumen resultante de la extracción (2 ml) fue evaporado en centrífuga de vacío (Centrivap Concentrator de Labconco) y guardado a -70 °C hasta el momento de la determinación. Para extraer la PGE liberada al medio de incubación, se acidificó el medio con HCl (1N) hasta un pH=3. Se agregó 1 ml de acetato de etilo y luego de mezclar se extrajo la fase superior. El procedimiento se realizó 3 veces y el volumen final fue evaporado en centrífuga de vacío. Las muestras fueron guardadas a -70 °C hasta el momento de la determinación. Las muestras y los reactivos fueron reconstituidos en PBS (0.01M, pH 7.4), conteniendo NaCl (0.15 M), 0.1 % de seroalbúmina bovina (BSA) y 0.1 % de azida sódica.

Las determinaciones se realizaron por RIA. Las fracciones (100 μ l) de los patrones y de los extractos de las muestras fueron incubadas con 500 μ l de antisuero (anti-PGE₂, SIGMA) por 30 min a 4 °C. Luego del agregado de 100 μ l del trazador ([³H]-PGE₂) (New England) (aprox. 4200 cpm / 100 μ l), la incubación se continuó por 60 min a 4 °C. Las formas unidas y libres se separaron con una suspensión de carbón : dextran (1 % : 0.1 %), se dejó reposar 10 minutos a 4 °C y se centrifugó por 15 minutos a 3200 rpm a 4 °C. Se volcó el sobrenadante en viales con líquido centelleador, se agitó y se determinaron las cpm en un contador de centelleo líquido. La sensibilidad del ensayo fue de 10 pg por tubo y la curva estándar mantiene la linealidad hasta 4000 pg / tubo de PGE, existiendo una reactividad cruzada del 100 % entre PGE₂ y PGE₁ y de menos de 0,1 % entre aquellas y otras prostaglandinas. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 8.2 y 12 % respectivamente. Las muestras fueron medidas por duplicado. Debido a la reactividad cruzada observada entre PGE₂ y PGE₁, los resultados fueron expresados como pg de PGE / mg de proteína.

3.9 Determinación de las concentraciones de GABA y glutamato por HPLC

La concentración de aminoácidos neurotransmisores, glutamato y GABA fue determinada por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Los medios de incubación fueron derivatizados con fenilisotiocianato (PITC). Luego, fueron filtrados e inyectados en forma manual a un sistema de HPLC con un detector de UV a 254 nm. Los límites de detección fueron 10 pM para glutamato y 5 pM para GABA. La separación de estos aminoácidos fue lograda mediante el pasaje por una columna ODS de fase reversa C18 poro de 5 μ m, 250 x 4 mm. La fase móvil utilizada estaba compuesta por buffer acetato de sodio (pH 6.5), conteniendo 10 % de acetonitrilo (Sintorgan, Bs. As., Argentina). Los

estándares de glutamato y GABA utilizados fueron provistos por SIGMA (Chemical Co St. Louis, Mo, USA). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 8 % y 5 %, respectivamente. Los resultados fueron expresados como pmoles de GABA o glutamato liberados por HMB.

3.10 Determinación de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS)

La actividad de la NOS fue determinada mediante una modificación del método de Bredt y Snyder (Bredt y Snyder 1989). Este ensayo se basa en la conversión de arginina en cantidades equimolares de NO y citrulina. Los tejidos fueron preincubados 10 min en KRB para su estabilización y luego incubados con las sustancias en estudio durante 30 min. Los tejidos fueron homogeneizados en 0.5 ml de Hepes 20 mM, pH 7.4 conteniendo ditioneitol 1 mM, CaCl₂ 0.45 mM y NADPH 0.1 mM. Una alícuota del homogenato fue separada para la determinación de la concentración de proteínas. Luego del agregado de 20 µl (0.1 µCi) de [¹⁴C]-arginina y de un período de incubación de 20 min a 37 °C, los homogenatos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue sembrado a una columna de 1 mL de Dowex 50 W-X8 en Hepes 20 mM, pH 7.4, cargada con 20 µl de L-citrulina 10 mM. La [¹⁴C]-citrulina fue eluída con 2 ml de agua destilada. Al eluato se le agregó líquido de centelleo y la radioactividad fue cuantificada en un contador de centelleo líquido. La actividad de la enzima obtenida en desintegraciones por minuto (dpm) por µg de proteína fue finalmente expresada en pmoles NO / mg de proteína / min, teniendo en cuenta la eficiencia del contador para transformar dpm en cuentas por minuto (cpm) y la actividad específica del trazador radioactivo.

3.11 Determinación de la actividad de la fosfolipasa C (PLC)

La actividad de la PLC se midió a partir de la determinación de la hidrólisis de fosfatidilinositol que fue determinada de acuerdo con el método descrito por Berridge y col. (Berridge y col. 1982). Los HMBs fueron removidos y preincubados durante 30 min en 500 μ l de una solución de Krebs-bicarbonato conteniendo LiCl (10 μ M) y mio [3 H]-inositol (2 μ Ci/500 μ l) pH 7.4. Finalizado el periodo de preincubación, el medio fue reemplazado por Krebs conteniendo LHRH a las distintas concentraciones en estudio y los HMBs fueron incubados durante 30 min adicionales. Finalizada la incubación, los HMBs fueron lavados dos veces con una solución de Krebs fría durante 5 minutos y homogeneizados con una mezcla de cloroformo : metanol (1 : 2 v/v). Para la separación de las fases, se adicionó a los homogenatos cloroformo (620 μ l) y agua (1ml), y luego se centrífugo a 2000 g durante 15 min). La fase superior fue incorporada a una columna de intercambio aniónico (Bio-Rad X8 resin, 100-200 mesh, formiate form) seguida de la adición de mio-inositol (5 mM). Las columnas fueron eluidas con formiato de amonio (1 M) y ácido formico (0.1 M). La fracción eluida contiene los isómeros del 1,4,5 inositol trifosfato, 1,3,4 inositol fosfato así como 1,2,3,4 inositol tetrafosfato. Esta fracción representa la actividad de la fosfolipasa C, dado que el 1,4,5 inositol trifosfato, su producto inmediato, es el precursor del resto de las formas sintetizadas (Taylor y col. 1986). La radioactividad fue determinada en un contador de centelleo para radiación β . Los resultados se expresan como porcentaje de hidrólisis del fosfatidilinositol con respecto al control.

3.12 Western blot

Se utilizó la técnica de western blot para determinar la presencia de la proteína de CB1 en el HMB. Los explantes de HMB de ratas macho fueron homogeneizados en 150 µl de buffer de lisis (Tris 20 mM pH 7.4) conteniendo inhibidor de proteasas (Protease inhibitor Cocktail, SIGMA) y EDTA 1 mM. Las muestras se dejaron en reposo a 4 °C durante 2 hs, luego se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min para precipitar los restos de tejido. Del sobrenadante, se tomó una alícuota para determinar la cantidad de proteínas por el método de Bradford (1976). Se sembraron 80 µg de proteína por calle, previamente reducidas agregando 5% de metamerctoetanol y calentando a 100 °C. Las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% con SDS (SDS-PAGE) a 100 V. Finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 30 V durante toda la noche a 4 °C, para proceder a realizar la detección inmunológica. El bloqueo de sitios de unión inespecíficos se realizó con una solución de albúmina al 2.5% en buffer TTBS. Luego, el anticuerpo anti-CB1 purificado en conejo (Cayman Chemical Company) fue incubado durante 3 hs en una dilución de 1: 500 a temperatura ambiente y agitación constante. Luego de los lavados, la membrana fue incubada durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (1: 2000). La inmunoreactividad fue revelada con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro tetrazolio azul (BCIP/NT) Sigma FAST como sustrato.

3.13 Inmunohistoquímica

3.13.1 Localización de fibras de LHRH en el HMB

Las ratas fueron anestesiadas con tribromoetanol y perfundidas con paraformaldehído 4 % en PBS (0.05 M pH 7.4) durante 30 min. Luego de la perfusión el HMB fue disecado, deshidratado e incluido en parafina. Los cortes de 7 μ m fueron montados en portaobjetos previamente gelatinizados. Las secciones fueron desparafinadas en xileno, rehidratadas e incubadas con solución de bloqueo (5% leche descremada en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente para bloquear los sitios inespecíficos. Luego de 3 lavados de 5 min con PBS, los cortes se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-LRH13 (1:5000) durante toda la noche. Este anticuerpo se une con alta afinidad a distintas variantes de LHRH, dado que reconoce porciones altamente conservadas del decapeptido, en particular a las regiones 4 (serina) y 5 (tirosina) (donado por el Dr. Wakabayashi, University of Gunma, Maebaeshi, Japan). Luego de 2 lavados, los cortes se incubaron con un segundo anticuerpo biotinilado anti-ratón IgG (1:1000) durante 45 min. La amplificación de la señal fue realizada incubando las secciones con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector Laboratorios, Burlingame, CA). La inmunomarcación fue evidenciada con 0.1% de 3,3-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno en buffer TRIS (pH 7.6) y 0.03 % de H₂O₂. Se realizó una coloración de contraste con hematoxilina de modo de visualizar más claramente las estructuras. Las imágenes fueron observadas con un microscopio NIKON microphot FX y fotografiadas digitalmente con una cámara Nikon, Coolpix 4500.

3.13.2 Localización de CB1 en el HMB

Las ratas fueron anestesiadas con tribromoetanol y perfundidas con paraformaldehído 4 % y ácido pícrico 0.2 % en PBS (0.05 M pH 7.4) durante 30 min. Luego de la perfusión el HMB fue disecado y post-fijado por 24 hs. Luego, las muestras se almacenaron en una solución de sacarosa 15% en PBS por 24 hs a 4°C. Posteriormente fueron criopreservadas a –20 °C en sacarosa 30% hasta el momento de realizar los cortes. Se realizaron cortes transversales en crióstato de 20 µm y éstos fueron colocados en portaobjetos cargados. Para localizar los receptores inmunoreactivos a CB1 en el área preóptica hipotalámica se utilizó un antisuero primario hecho en conejo contra CB1 (1: 1000 en PBS) gentilmente provisto por el Dr. Mackie (Departamento de Anestesiología, Universidad de Washington, Seattle, WA, USA). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-conejo unido a Rhodamina. Se realizaron inmunomarcaciones de CB1 en hipocampo como control positivo, donde se sabe por datos bibliográficos que estos receptores son muy abundantes. Los portaobjetos fueron examinados con un microscopio de fluorescencia (Axioskop 40, Karl Zeiss) y las imágenes fueron capturadas usando un sistema fotográfico Axovision 3.1 (Zeiss) o con microscopía confocal (Olympus BX 61). Las estructuras relevantes del hipotálamo fueron identificadas utilizando el atlas de Paxinos y Watson (1997).

3.14 Determinación de β-endorfina por RIA

Para la determinación se utilizó un antisuero altamente específico anti-β-endorfina gentilmente provisto por George Chrousos (National Institute of Health and Human Development, Bethesda). Los estándares fueron reconstituidos en buffer LHRH (PBS 0.01 M, NaCl 17 %, gelatina 2 %, timerosal 20 %, EDTA 18.6 %). Las fracciones (100 µl) de los

estándares y de las muestras fueron incubadas en 100 µl de anisero anti-βendorfina durante 2,5 hs a 4 °C. La dilución final del antisero fue determinada a través de ensayos de unión. Luego del agregado de 100 µl del trazador radioactivo (aprox. 4500 dpm / 100 µl ¹²⁵I-βendorfina) la incubación se continuó por 20 hs a 4 °C. Las formas unidas y libres se separaron con el agregado de 1 ml de etanol absoluto en baño de hielo, agitación intensa y posterior centrifugación durante 30 min a 3000 rpm y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se contó la radioactividad contenida en el pellet. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 5 % y 7 %, respectivamente. Los resultados fueron expresados como pg de βendorfina / HMB.

3.15 Extracción de las adenohipófisis (AH) y experimentos *in vitro*

Los animales fueron sacrificados por decapitación. La adenohipófisis (AH) fue removida rápidamente separándola de la neurohipófisis. Las AH fueron separadas cuidadosamente en sus porciones izquierda y derecha y fueron incubadas *in vitro* como hemi-AH. El protocolo utilizado para las incubaciones de las hemi-AH fue el mismo que el descrito para los HMBs.

3.16 Experimentos *in vivo*

Para inducir la endotoxemia, el LPS (5 mg / Kg, *Escherichia coli* serotipo 0111:B8) fue inyectado intraperitonealmente (i.p.) disuelto en 250 µl de NaCl 0.9 % estéril, mientras que los animales del grupo control fueron inyectados con el mismo volumen del vehículo. Luego de 3 horas, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y el HMB extraído rápidamente. Para administrar las drogas a través del ventrículo lateral del cerebro se

implantaron cánulas de acero inoxidable una semana antes del experimento. Para ello los animales fueron anestesiados con tribromoetanol 3.5 % (1 ml / 100 g de peso corporal) y colocados en un estereotáxico. Las coordenadas relativas a la línea interaural: A-P: 0.6 mm; L: -2 mm; D-V: -3.2 mm, fueron tomadas del atlas estereotáxico de Pellegrino y col. (1979). Las drogas administradas vía ventrículo lateral fueron AEA (50 ng / 5 μ l), AM251 (500 ng / 5 μ l), TNF- α (100 ng / 5 μ l), y sus respectivos vehículos (5 μ l).

3.17 Protocolo de extracción de sangre a lo largo del tiempo

Veinticuatro horas antes del experimento, se colocó un catéter de silastic en la vena yugular externa derecha, avanzando hacia la aurícula derecha, para la recolección de las muestras de sangre de acuerdo a la técnica descrita por Harms y Ojeda (1974). El día del experimento, las ratas fueron divididas en cuatro grupos. Luego de la recolección de la primera muestra de sangre (0.5 ml), las ratas fueron micro-inyectadas con una jeringa Hamilton vía intracerebro-ventrículo lateral (i.c.v) durante 1 min con: 5 μ l del vehículo correspondiente, 5 μ l de AM251 (500 ng), 5 μ l de AEA (50 ng), ó 5 μ l de AM251 (500 ng) + 5 μ l AEA (50 ng). Este último grupo recibió primero la microinyección de AM251 y 30 min después, la de AEA, para permitir la unión del antagonista de CB1 al receptor antes de que tome contacto con el agonista. Cada 30 min se realizó la recolección de sangre (0.5 ml) a lo largo de 90 min. Luego de cada extracción, la volemia fue restituida agregando 0.5 ml de salina conteniendo 50 IU de heparina / ml. El plasma fue separado por centrifugación a 3000 rpm durante 30 min a 4 °C y luego congelado a -70 °C y guardado hasta el día de la determinación de LH por RIA.

3.18 Determinación de LH por RIA

3.18.1 Marcación de la hormona LH

Para la marcación de LH se utilizó el método de cloramina T. Se procedió de la siguiente manera: a una alícuota de LH (2.5 µg / 30 µl) se le agregaron 30 µl de buffer fosfato 0,5 M pH 7.5. A esta mezcla se le agregó 1 mCi de ¹²⁵I y 10 µl de cloramina T (30 µg / 10 µl en buffer PBS 0.05 M pH 7.5). Se dejó reaccionar 60 segundos agitando. La reacción se detuvo con 25 µl de metabisulfito de sodio (2.5 mg / ml de buffer 0.05 M pH 7.5). Luego se sembró la mezcla sobre una columna de Bio-Gel (P-60), colectando fracciones de 0.5 ml en tubos que contenían 100 µl de buffer de LH, utilizando PBS EDTA 0.05 M como buffer de elusión. Entre los tubos 4 y 5 se observa el pico de la hormona marcada. Se determinó que tubo contenía mayor cantidad de cuentas y se utilizó esa fracción para calcular la cantidad óptima de cuentas por minuto a utilizar en el RIA.

3.18.2 Metodología del RIA de LH

La concentración de LH en plasma y en los medios que fueron incubados con hemioadenohipófisis fue determinada por RIA en PBS (pH 7.6), conteniendo BSA 1% como diluyente y [¹²⁵I]-LH como trazador (10000 cpm/tubo). Se utilizó como patrón la preparación estándar de LH de rata NIH-rLH-RP-2. El anticuerpo anti-LH fue disuelto en buffer PBS-EDTA 0.025 M conteniendo NRS 1%. Esta mezcla fue mantenida a 4°C durante 72 horas y la reacción fue detenida mediante el agregado de suero anti-gammaglobulina de conejo obtenido en oveja diluído 1:20 en buffer PBS y 1 mL PEG 6%. Las muestras fueron centrifugadas a 3200 rpm durante 30 min y la radioactividad del precipitado determinada en un contador gamma. Los reactivos que se utilizaron fueron antisuero anti LH de rata

(NIDDK-anti-rLH-SII), antígeno (NIDDK-2LH-I-9) y estándar de referencia (NIDDK-2LH-RP3) que fueron comprados a NIH Pituitary, Hormone and Antisera Center, Harbor-UCLA Medical Center (Torrance, CA). La concentración sérica de LH fue expresada como ng/ml y, en el caso de las incubaciones *in vitro*, como pg/hemi-adenohipófisis. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 3.6 y 6.6 %, respectivamente.

3.19 Medición de la actividad de AEA sintasa

La actividad de AEA sintasa fue medida según la técnica descrita por Paria y col. (1996) con modificaciones menores. Los HMBs fueron homogeneizados en 200 μ l de buffer Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6 y centrifugados a 3000 rpm durante 15 min. 150-100 μ g de proteína sobrenadante fueron incubados en un volumen total de 200 μ l de Tris-HCl (5×10^{-2} M, pH 9.0) con 40 μ M (0.1 μ Ci) de [14 C]-ácido araquidónico (40-60 mCi / mmol, Perkin Elmer, Boston, MA) y 2×10^{-2} M etanolamina durante 5 min a 37 °C. La reacción fue finalizada con la adición de 400 μ l de una mezcla cloroformo:metanol (1: 1). Se realizaron dos lavados de la fase acuosa con 400 μ l de cloroformo. La fase orgánica fue evaporada a sequedad bajo nitrógeno y redisolto en 40 μ l de una mezcla cloroformo: metanol (1: 1). Las muestras y los estándares fueron aplicados sobre placas de sílica gel (60 plates) con zona de concentración (Merck, Germany). La [14 C] anandamida sintetizada fue separada corriendo la placa en un sistema cromatográfico compuesto por una mezcla de acetato de etilo: hexano: ácido áctico: H₂O (100: 50: 20: 100). Para identificar la distribución de las especies separadas por el sistema cromatográfico, la placa fue expuesta a un ambiente saturado en yodo que reacciona con las estructuras lipídicas.

Los valores de referencia (Rf) de anandamida y ácido araquidónico fueron de 0.33 y 0.78, respectivamente. Una vez identificado el sector de la placa correspondiente a [¹⁴C]-anandamida, se incorporaron los trozos de sílica conteniéndola en viales y luego del agregado de líquido centellador (Hi-Safe de Wallace) se procedió a determinar la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

3.20 Evaluación estadística de los resultados

Los datos fueron expresados como la media \pm ES. Las medias de los experimentos fueron analizadas estadísticamente utilizando: test “t” de Student para muestras no apareadas para comparación entre dos grupos, análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por el test de Dunnett para comparaciones con el grupo control o el test de Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de “p” fue menor al 5 %. Todos los experimentos fueron repetidos 2 o 3 veces. Las figuras representan resultados de experimentos individuales.

4.1 Mecanismos involucrados en la liberación de LHRH.

4.1.1 Localización de fibras de LHRH

La presencia de terminales nerviosas de LHRH en la eminencia media (EM) de la rata se encuentra ampliamente descrita en la bibliografía. Sin embargo, se consideró importante confirmar la presencia y la distribución de fibras inmuno-reactivas de LHRH en una de las unidades experimentales estudiadas en esta tesis, el complejo HMB-EM de rata Wistar macho adulta (figura 8). En el estrato externo de la EM pueden observarse fibras de LHRH. Estas terminales nerviosas, que provienen de cuerpos neuronales dispersos en el área preóptica hipotalámica, convergen en el área retroquiasmática y atraviesan caudalmente la zona premamilar terminando en la interfase con el plexo portal primario de la adenohipófisis.

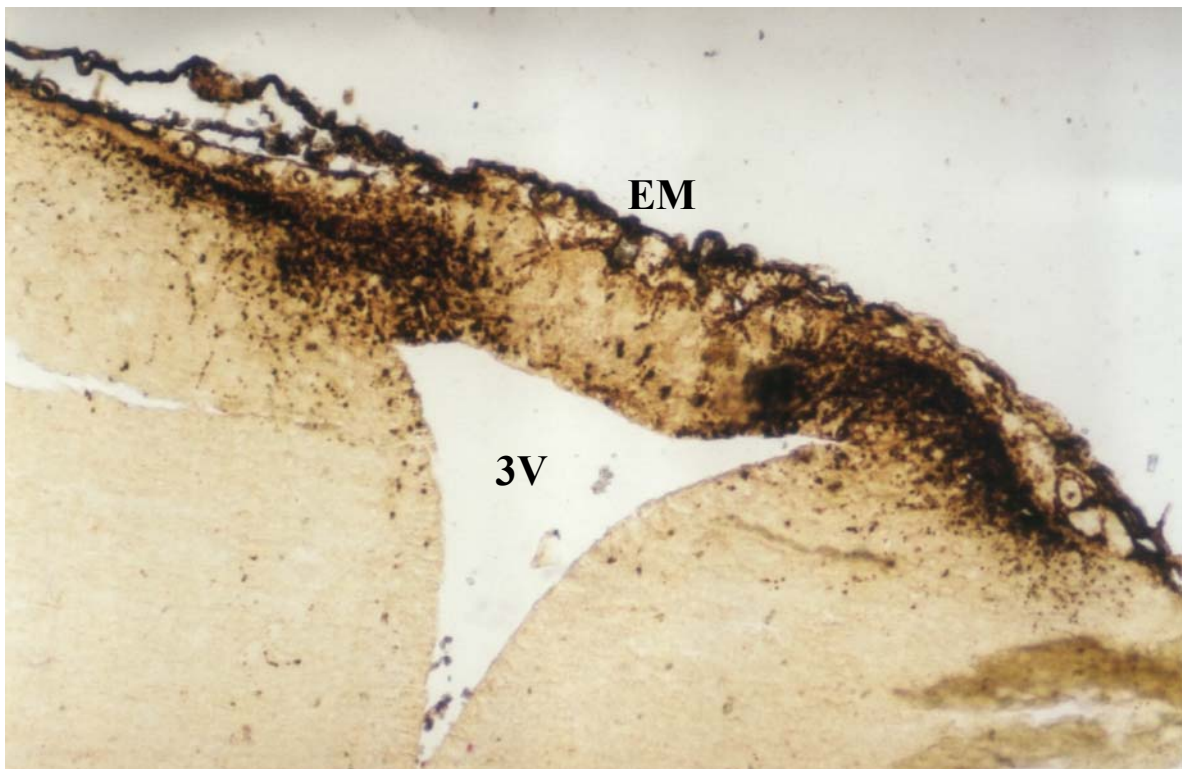


Figura 8. Distribución de fibras de LHRH en la EM. La fotografía muestra la localización de fibras de LHRH en la eminencia media (EM) inmunomarcadas con el anticuerpo monoclonal anti-LRH13 que reconoce con alta afinidad distintas variantes de LHRH (magnificación 10X). 3V, 3^{er} ventrículo.

4.1.2 Mediadores de la liberación de LHRH

Como se ha descrito en la introducción, existen distintos mecanismos intracelulares que conducen a la liberación de LHRH desde sus terminales nerviosas hacia la interfase con los vasos porta-hipofisarios. Los mecanismos más estudiados involucran al AMPc, la PGE₂ y el GMPc como mensajeros celulares de este proceso. Por lo tanto, el primer paso a seguir fue determinar el efecto de estos mediadores sobre la liberación de LHRH en HMBs incubados *in vitro* durante 30 minutos en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos. La forskolina (FRSK, 8×10^{-5} M), un activador de la enzima AC, incrementó muy significativamente (aproximadamente 6 veces) la liberación de LHRH con respecto al grupo control (Figura 9A). Cabe destacar que en este caso los HMBs fueron incubados en presencia de IBMX (10^{-4} M), un inhibidor de fosfodiesterasas, que evita la degradación del AMPc. Por otro lado, la PGE₂ (10^{-7} M) también incrementó significativamente (aproximadamente 3 veces) la liberación de LHRH (Figura 9B). El SQ22536 (10^{-4} M), un inhibidor de la AC, bloqueó parcial pero significativamente la liberación de LHRH estimulada por la PGE₂, sugiriendo que la prostaglandina actuaría al menos en parte incrementando la producción del AMPc en la vía de liberación de LHRH. De todos modos, no se descarta un probable efecto estimulador de la PGE₂ independiente de AMPc, dado que los HMBs incubados en presencia de esta prostaglandina junto con el SQ22536 presentaron una liberación de LHRH significativamente mayor a la del grupo control. Además, al intentar medir el contenido del nucleótido en los HMBs incubados con PGE₂ y SQ22536, éste no pudo ser detectado (dato no mostrado). Por otro lado, el dibutiril GMPc (dbGMPc, 10^{-4} M), un análogo del GMPc permeable a membranas celulares, incrementó significativamente la liberación de LHRH (aproximadamente 3 veces) (Figura 9C). Este efecto estimulador fue bloqueado solo parcialmente en presencia de indometacina

(Indo, 10^{-3} M), un inhibidor inespecífico de la enzima ciclooxigenasa. Además, el contenido de PGE en los HMBs incubados en presencia de dbGMPc e indometacina fue de una magnitud diez veces menor que en el grupo control (Figura 11). Estos resultados sugieren que el dbGMPc incrementa la liberación de LHRH, al menos, por dos mecanismos, uno independiente y otro dependiente de prostaglandinas.

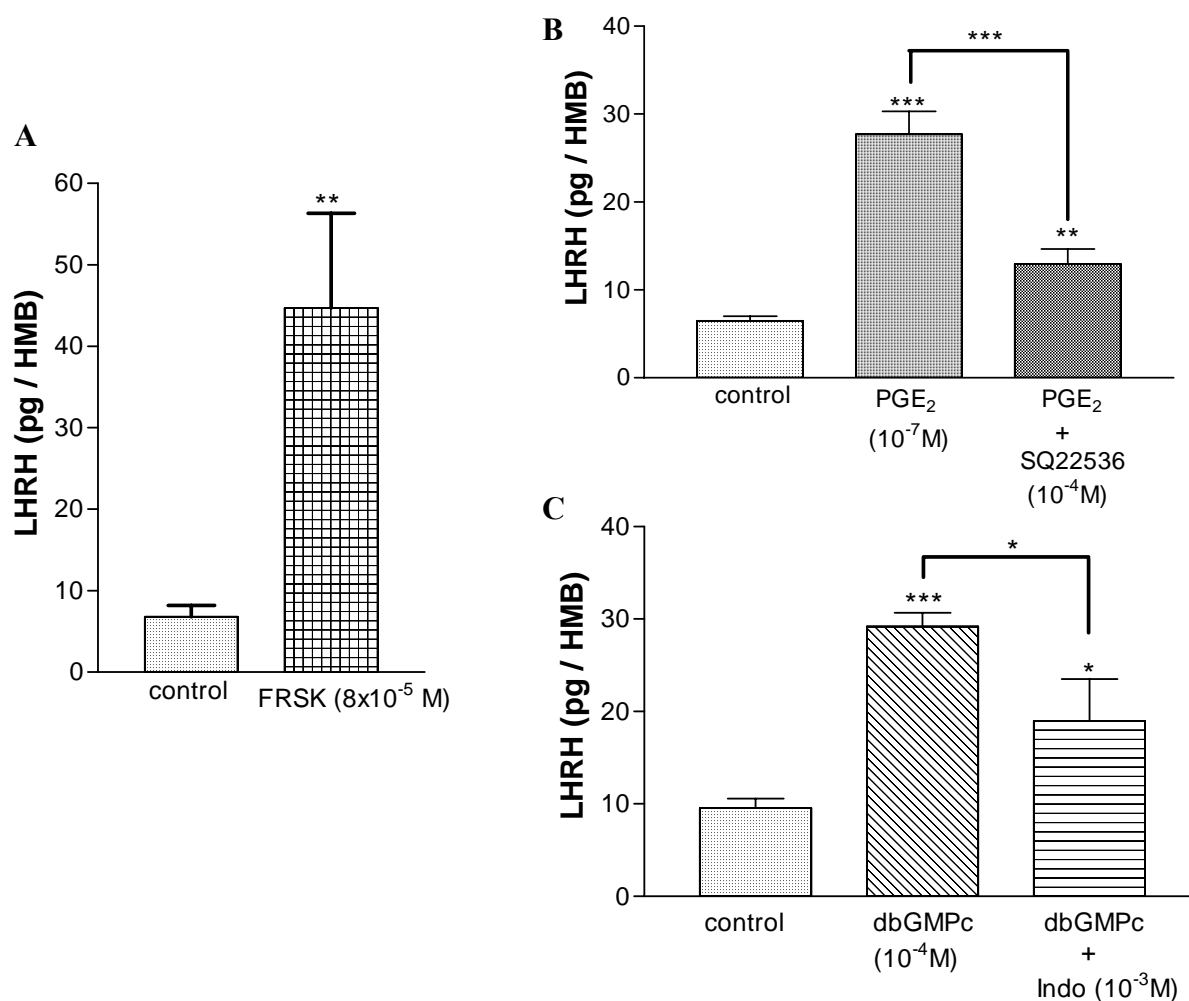


Figura 9. Mediadores de la liberación de LHRH . (A) Efecto de FRSK sobre la liberación de LHRH. Análisis por test t de Student. **(B)** Efecto de PGE₂ y **(C)** de dbGMPc sobre la liberación de LHRH. Análisis por ANOVA seguido del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. Los resultados se expresan en pg de LHRH liberada por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMBs. Los experimentos fueron realizados 2 o 3 veces. *= $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$ vs. control o vs el grupo indicado en cada caso con conectores. Indo= indometacina.

Dado que existen distintas vías estimulatorias de la liberación de LHRH, uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue determinar la interacción entre los distintos mediadores involucrados en su liberación. Los HMBs incubados con dbGMPc (10^{-4} M), mostraron una disminución significativa en el contenido de AMPc con respecto al grupo control (Figura 10A). Sin embargo cuando los HMBs fueron incubados en presencia de monobutiril AMPc (mbAMPc, 10^{-4} M), un análogo de AMPc permeable a membranas celulares y resistente a la degradación por fosfodiesterasas, no se observaron diferencias significativas en el contenido de GMPc con respecto al grupo control (Figura 10B).

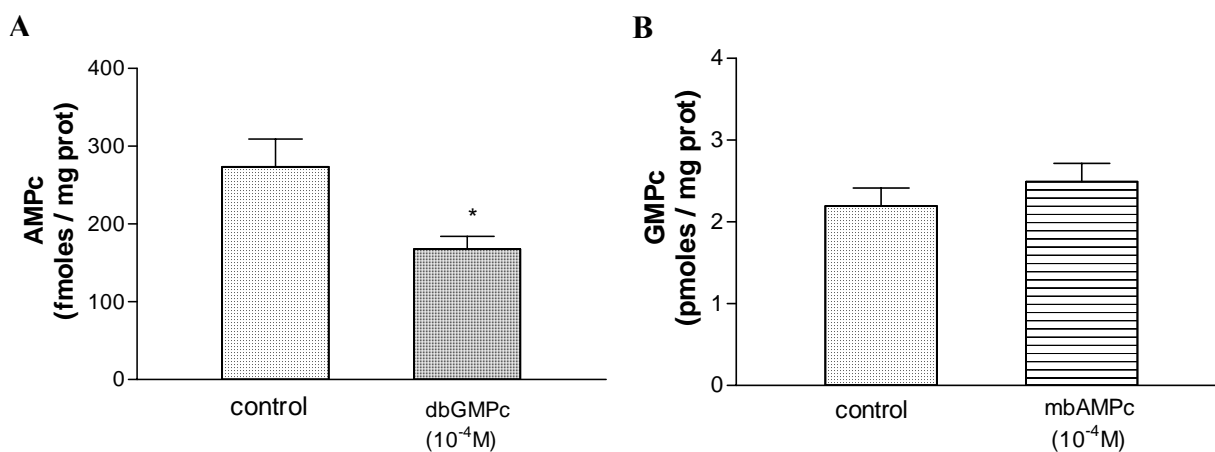


Figura 10. Interacción entre nucleótidos cíclicos. (A) Efecto del dbGMPc sobre el contenido hipotalámico de AMPc. (B) Efecto del mbAMPc sobre el contenido hipotalámico de GMPc. Los resultados se expresan en fmoles de AMPc o pmoles de GMPc por mg de proteína contenidos en los HMBs luego de 30 min de incubación. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMBs. Los experimentos fueron realizados 2 o 3 veces. *= $p < 0.05$ vs. Control. Los datos fueron analizados por test t de Student

Con respecto a la interacción entre los nucleótidos cíclicos y las prostaglandinas, en primer lugar, el dbGMPc (10^{-4} M) incrementó significativamente el contenido de PGE, en HMBs incubados *in vitro*, con respecto al grupo control (Figura 11A). Sin embargo, cuando los HMBs fueron incubados en presencia de dbGMPc e indometacina (10^{-4} M), un inhibidor inespecífico de la COX, no solo se previno el incremento en los niveles de PGE, sino que además se desencadenó una disminución de los mismos a valores muy por debajo de los valores control. Por otro lado, los HMBs incubados en presencia de mbAMPc (10^{-4} M y 10^{-3} M) mostraron una disminución significativa en el contenido de PGE con respecto al grupo control (Figura 11B). Adicionalmente, cuando los HMBs fueron incubados en presencia de FRSK (8×10^{-5} M), un activador de la adenilato ciclasa, e IBMX (10^{-4} M), un inhibidor de las fosfodiesterasas que degradan al AMPc, también se observó una disminución significativa del contenido de PGE (Figura 11C). La disminución del contenido de PGE inducida por AMPc tendría una implicancia fisiológica importante, ya que podría contribuir a la finalización de la señal estimulatoria de la liberación de LHRH.

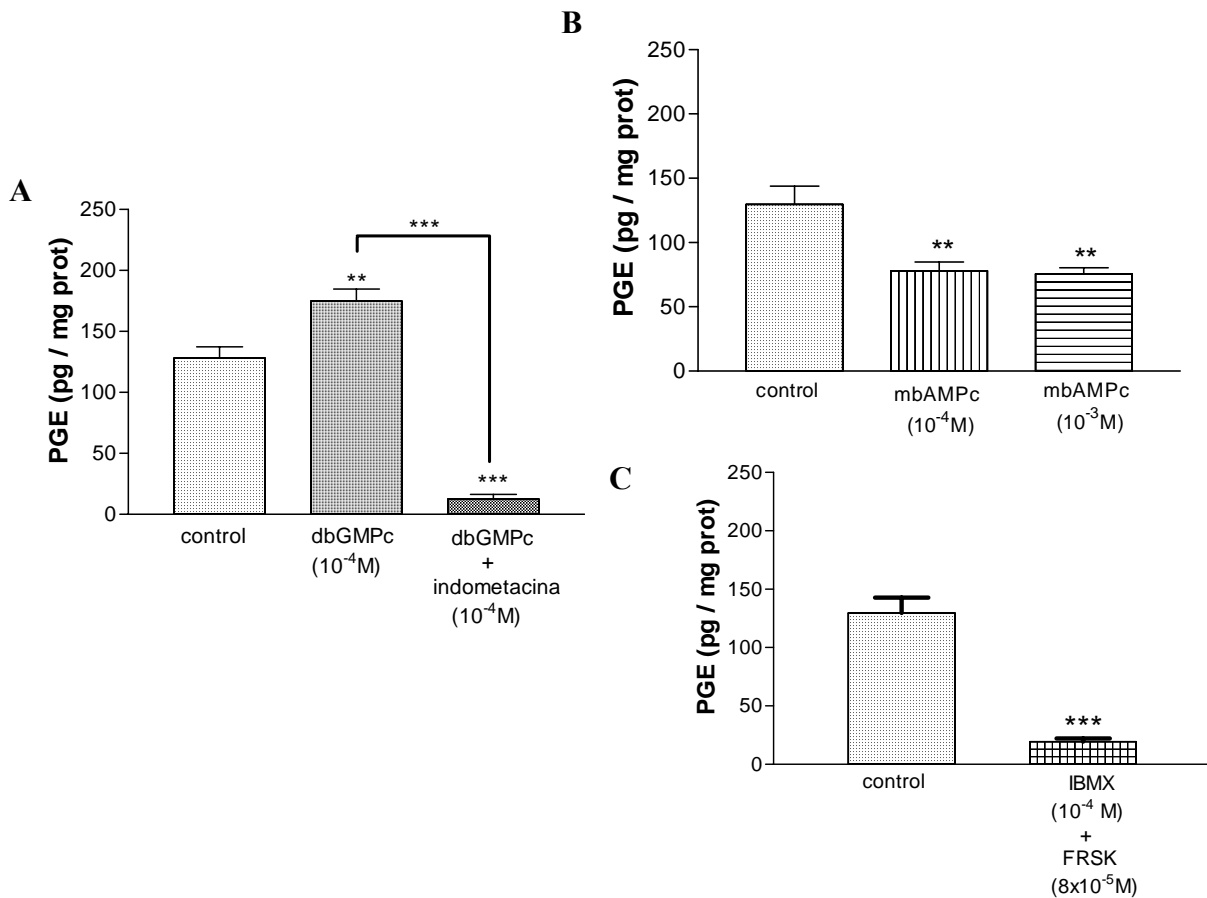


Figura 11. Efecto de los nucleótidos cíclicos sobre el contenido de PGE. (A) Efecto del dbGMPc en ausencia o presencia de indometacina sobre el contenido de PGE. (B) Efecto del mbAMPc sobre el contenido de PGE. (C) Efecto de FRSK e IBMX sobre el contenido de PGE. Los resultados se expresan en pg de PGE por mg de proteína contenidos en los HMBs luego de 30 min de incubación. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMBs. Los experimentos fueron realizados 2 o 3 veces. **= $p < 0.01$ y ***= $p < 0.001$ vs. Control o vs el grupo indicado con el conector. Análisis estadístico: ANOVA seguido del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples (A), ANOVA seguido de test de Dunnet para comparaciones con el control (B), test t de Student para comparaciones entre dos grupos (C).

Según datos bibliográficos, la PGE_2 actúa sobre receptores neuronales de membrana, por lo cual debe ser liberada de las células para ejercer su efecto. Por lo tanto se estudiaron los efectos de la FRSK y del mbAMPc sobre la liberación de PGE al medio de incubación. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la liberación de este eicosanoide en los HMBs incubados en presencia de FRSK (8×10^{-5} M) e IBMX (10^{-4} M) (Figura 12A), ni en aquellos incubados con mbAMPc (10^{-4} M, 10^{-5} M), con respecto a sus respectivos controles (Figura 12B). Estos resultados sugieren que los efectos inhibitorios del AMPc serían sobre la producción de la PGE_2 y no sobre su liberación.

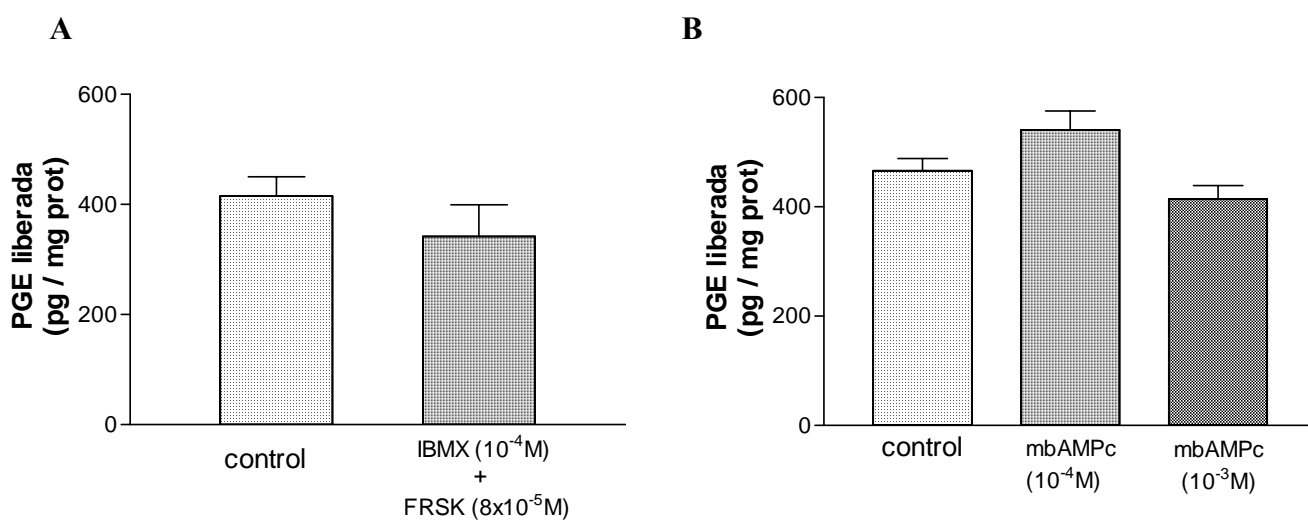


Figura 12. Efectos de FRSK e IBMX (A) y del mbAMPc (B) sobre la liberación de PGE. Los resultados se expresan en pg de PGE por mg de proteína liberada al medio de incubación por los HMBs durante 30 min. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMBs. Los experimentos fueron realizados 3 veces. Los datos fueron analizados por test t de Student

Cabe destacar que las concentraciones de los distintos compuestos utilizados para el estudio de los mecanismos involucrados en la liberación de LHRH fueron seleccionadas en base a datos bibliográficos junto con ensayos preliminares de curvas dosis respuesta.

4.1.3 Conclusiones parciales

- Se aportan elementos que corroboran que el AMPc, el GMPc y la PGE₂ son mensajeros celulares involucrados en la liberación de LHRH en ratas macho adultas.
- La PGE₂ estimula la liberación de LHRH al menos a través de dos vías: una que involucra incrementos en la producción del AMPc y otra independiente del nucleótido.
- El GMPc estimula la liberación de LHRH al menos a través de dos vías: una que involucra incrementos en la producción de la PGE₂ y otra independiente de la prostaglandina.
- El AMPc estimula la liberación de LHRH pero inhibe la producción de prostaglandinas, por lo tanto podría formar parte de un mecanismo de control de la liberación episódica del neuropéptido.

4.2 Mecanismos de auto-regulación de LHRH

4.2.1 Efecto de LHRH sobre los mediadores de su liberación

Los HMBs fueron incubados durante 30 minutos con distintas concentraciones de LHRH en el rango fisiológico (10^{-11} , 10^{-9} y 10^{-7} M), en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Con respecto a los principales neurotransmisores (NT) involucrados en la liberación de LHRH, el GABA, un NT inhibitorio, presentó un incremento significativo en su liberación cuando los HMBs fueron incubados en presencia de LHRH 10^{-11} M. Sin embargo, las concentraciones de LHRH de 10^{-9} M y 10^{-7} M, no evidenciaron cambios significativos en la liberación de este aminoácido con respecto al grupo control (Figura 13A). Por otro lado la liberación de glutamato, NT estimulador de la liberación del decapeptido, no sufrió cambios significativos cuando los HMBs fueron incubados con LHRH 10^{-11} M, pero se vio disminuida significativamente con las concentraciones de 10^{-9} M y 10^{-7} M con respecto a los controles (Figura 13B).

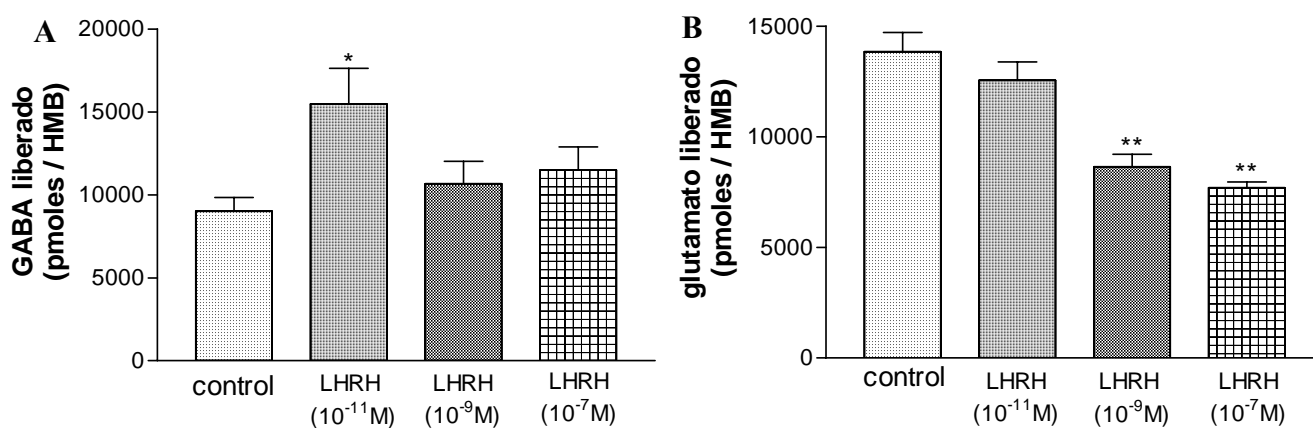


Figura 13. Efecto de LHRH sobre la liberación de GABA y glutamato. Los resultados se expresan en pmoles de GABA (A) o de glutamato (B) liberados al medio de incubación por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMBs. Los experimentos fueron realizados 2 veces. *= $p < 0.05$ y **= $p < 0.01$ vs. Control. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Dunnet para comparaciones con el grupo control.

LHRH, a concentraciones del orden nanomolar (10^{-11} M y 10^{-9} M), incrementó significativamente el contenido de AMPc, mientras que a una concentración de LHRH de 10^{-7} M no se observaron cambios significativos con respecto al grupo control (Figura 14). Se ha descrito que la activación de cierta población de receptores extra-hipotalámicos de LHRH desencadena incrementos en la actividad de la AC (Liu y col. 1981). Si bien esta enzima es activada por muchos otros mecanismos fisiológicos, no debe descartarse, que el incremento hipotalámico en los niveles de AMPc producido por LHRH (10^{-11} y 10^{-9} M) pueda deberse a la activación de receptores acoplados a proteína Gs, que transducen señales por medio de este nucleótido cíclico.

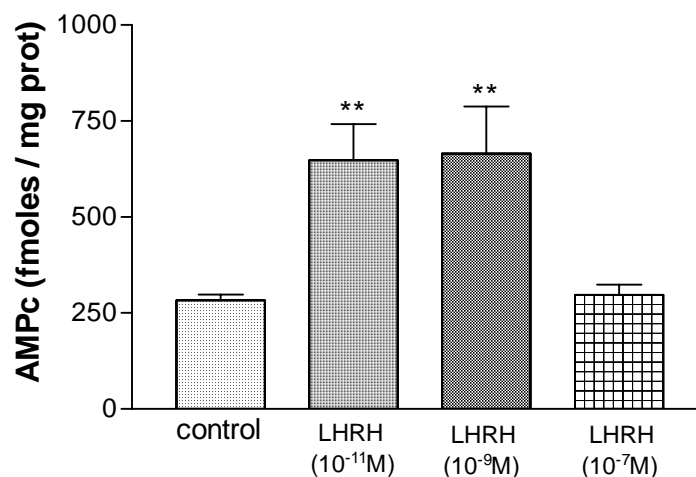


Figura 14. Efecto de LHRH sobre el contenido de AMPc. Los resultados se expresan en fmoles de AMPc por mg de proteína contenidos en los HMBs luego de 30 min de incubación. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMBs. Los experimentos fueron realizados 3 veces. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Dunnet para comparaciones con el grupo control. **= $p < 0.01$ vs. Control.

En cuanto a los efectos de LHRH sobre las prostaglandinas, se estudiaron tanto los efectos sobre el contenido de la PGE como sobre su liberación desde los HMBs al medio de incubación. LHRH inhibió significativamente el contenido de PGE a las 3 concentraciones estudiadas (10^{-11} , 10^{-9} y 10^{-7} M) (Figura 15 A), mientras que solo los HMBs incubados con LHRH 10^{-9} M mostraron una pequeña disminución en la liberación de la PGE hacia el medio de incubación (Figura 15B).

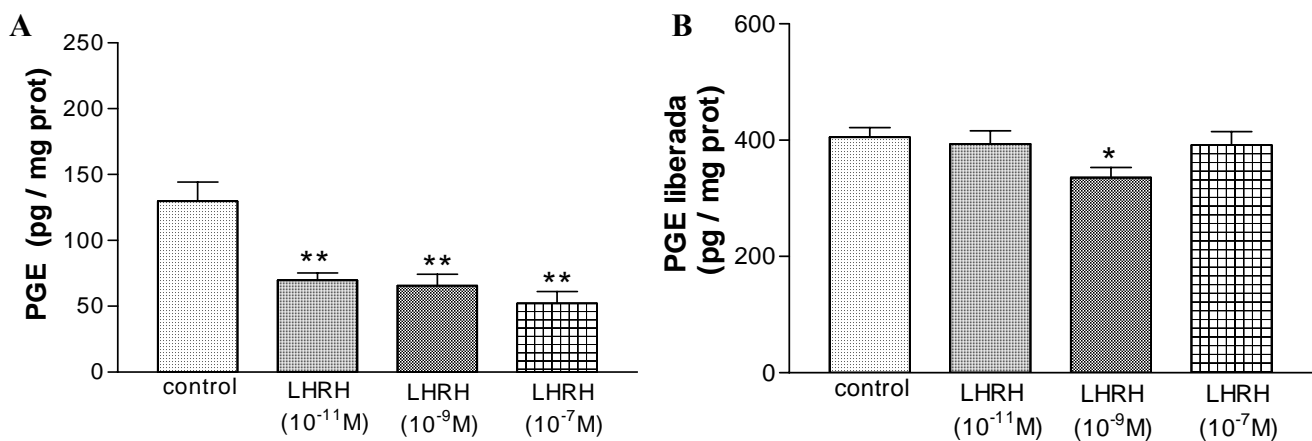


Figura 15. Efecto de LHRH sobre el contenido y la liberación de PGE. Los resultados se expresan en pg de PGE por mg de proteína contenida en los HMB luego de 30 min **(A)** o liberada al medio de incubación por los HMBs luego de transcurrido el mismo tiempo **(B)**. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMB. Los experimentos fueron realizados 2 veces. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Dunnet para comparaciones con el grupo control. *= $p < 0.05$ y **= $p < 0.01$ vs. Control.

Con el objeto de estudiar los efectos de LHRH sobre su vía de liberación mediada por GMPC, en primer lugar, se midió la actividad de la enzima oxido nítrico sintasa (NOS) en HMBs previamente incubados con LHRH (10^{-11} , 10^{-9} y 10^{-7} M). Se observó un

incremento en la actividad de la enzima en los HMBs incubados con LHRH 10^{-7} M, no registrándose diferencias significativas con las concentraciones menores (Figura 16).

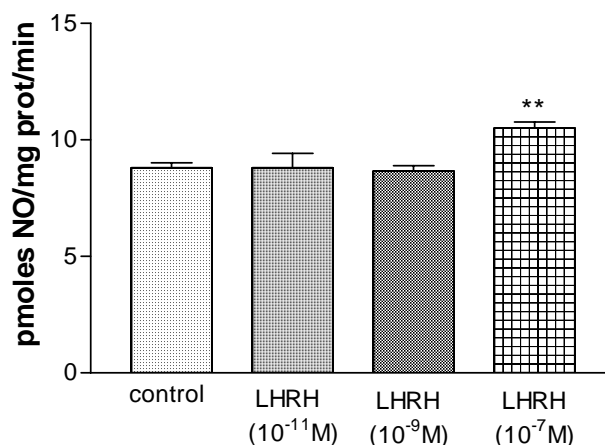


Figura 16. Efecto de LHRH sobre la actividad de la NOS. Los resultados se expresan en pmoles de NO por mg de proteína producidos por los HMBs durante 30 min. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMB. Los experimentos fueron realizados 2 veces. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Dunnet para comparaciones con el grupo control. **= $p < 0.01$ vs. Control.

Si bien es sabido que el óxido nítrico (NO) estimula la actividad de la guanilato ciclasa por interacción del oxígeno con el grupo hemo de enzima, se estudió el efecto de un dador rápido de NO, el nitroprusiato de sodio (NP), sobre el contenido de GMPc, para corroborar su efecto en los extractos de HMB. El NP (6×10^{-4} M) estimuló significativamente el contenido del GMPc con respecto al grupo control (Figura 17A). Por otro lado, LHRH, a la misma concentración que estimuló la actividad de la NOS (10^{-7} M), incrementó el contenido de GMPc, no evidenciándose diferencias significativas con respecto al control en los HMBs incubados con LHRH a las otras concentraciones estudiadas (Figura 17B).

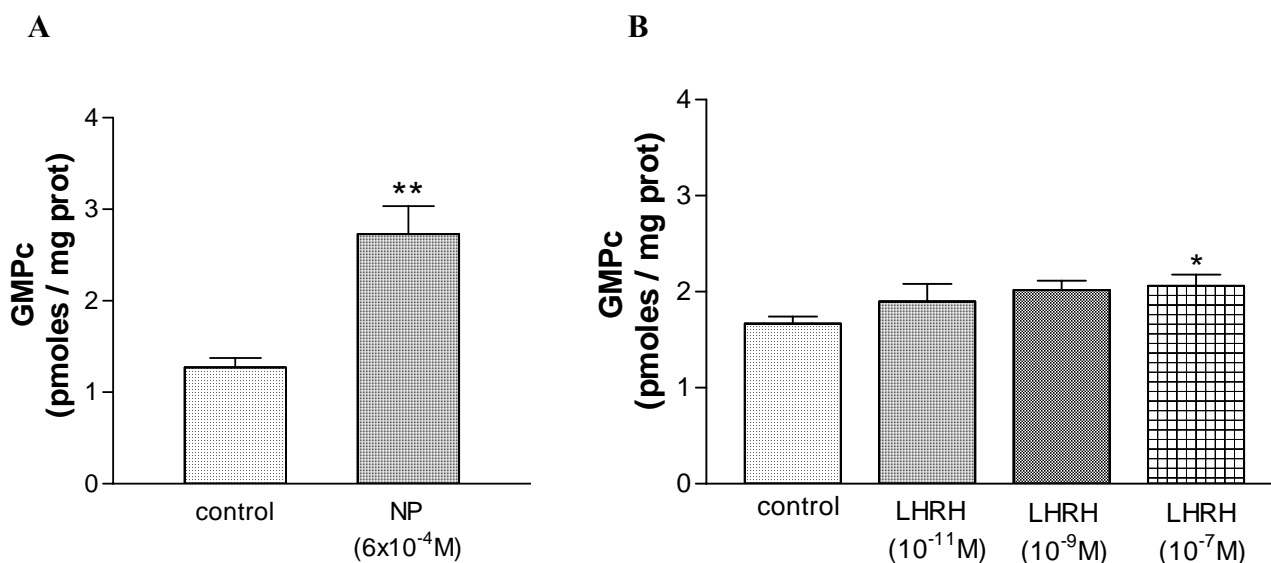


Figura 17. Efectos del nitroprusiato de sodio (A) y de LHRH (B) sobre el contenido de GMPc.

Los resultados se expresan en pmoles de GMPc por mg de proteína contenidos en los HMBs luego de 30 min de incubación. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMB. Los experimentos fueron realizados 3 veces. Análisis estadístico: (A) Test t de Student, (B) ANOVA seguida del test de Dunnet para comparaciones con el grupo control. *= $p < 0.05$ y **= $p < 0.01$ vs.

La magnitud de hidrólisis del fosfatidilinositol representa un índice de actividad de la fosfolipasa C (PLC) que genera como productos de tal reacción a los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). Es conocido que la mayoría de los receptores de LHRH adenohipofisarios se encuentran acoplados a una PLC y que su activación desencadena una cascada de transducción de señales que culmina con la liberación de LH y FSH (Stojilkovic y col. 1994). Los resultados de la hidrólisis del fosfatidilinositol obtenidos en la presente tesis indican que LHRH solo incrementó, leve pero significativamente, la actividad de la PLC a la concentración de 10^{-7} M (figura 18), sugiriendo que los receptores de LHRH acoplados a PLC solo serían activados a concentraciones fisiológicas elevadas del

decapéptido. Esta concentración de LHRH (10^{-7} M) es la misma a la que se observaron los incrementos de NO y GMPc. Por lo tanto, es probable que los receptores de esta población tengan un umbral elevado y que al ser activados induzcan la vía del NO / GMPc.

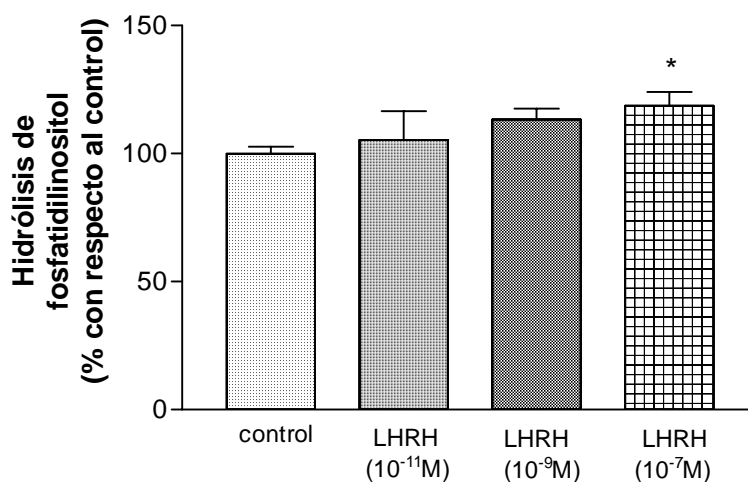


Figura 18. Efecto de LHRH sobre la hidrólisis del fosfatidilinositol. Los resultados se expresan en % de hidrólisis de fosfatidilinositol en los HMBs luego de 30 min de incubación. El valor control promedio representa el 100 %. Cada columna representa la media \pm SEM de 6 HMB. Los experimentos fueron realizados 2 veces. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Dunnet para comparaciones con el grupo control. $*=p<0.05$ vs. Control.

Los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones de LHRH sobre los mediadores hipotalámicos de su liberación indican la generación de respuestas diferenciales para cada una de las concentraciones estudiadas. Es imposible determinar estrictamente, con los estudios realizados, cual es el efecto final sobre la liberación del decapeptido. Sin embargo, lo más probable es que el efecto final sea el auto-inhibitorio, dado que para todas las concentraciones de LHRH estudiadas se observó estimulación de la liberación de GABA y/o inhibición de la liberación de glutamato, que son los principales NT que rigen la

liberación episódica del decapeptido. Por lo tanto estos resultados sustentan la existencia de una retroalimentación negativa de LHRH que actuaría sobre sus receptores en el hipotálamo para controlar su propia liberación. El esquema de la figura 19 resume los efectos bilaterales entre LHRH y los principales mediadores de su liberación.

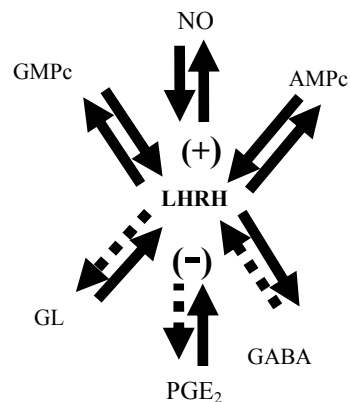


Figura 19. Esquema general que resume las interacciones entre LHRH y los factores que afectan su liberación. Las flechas continuas indican efectos estimulatorios y las discontinuas, inhibitorios. GL=glutamato.

4.2.2 Conclusiones parciales

- LHRH ejerce una retroalimentación negativa sobre su propia liberación incrementando la actividad GABAérgica y disminuyendo la glutamatérgica.
- Los efectos inhibitorios de LHRH sobre su propia liberación serían mediados por una inhibición en la producción de la PGE₂.
- El rol de los nucleótidos cíclicos en los mecanismos de retroalimentación negativa de LHRH no ha sido dilucidado. Sin embargo, un incremento en los niveles del AMPc podría contribuir a mantener bajos los niveles de la PGE₂ y por ende frenar la liberación de LHRH.

• 4.3 Efectos de AEA sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico

4.3.1 El sistema endocannabinoide como modulador de la liberación de LHRH

4.3.1.1 Identificación de los CB1 en el hipotálamo

Si bien existen reportes en la bibliografía que indican la presencia de receptores de cannabinoides tipo 1 (CB1) en diferentes áreas del cerebro de la rata, en el presente trabajo de tesis se corroboró la presencia de estos receptores en las regiones hipotalámicas implicadas en la liberación de LHRH. El análisis por Western blot evidenció la presencia de los CB1 en los HMBs que constituyen nuestra unidad experimental en los experimentos *in vitro* (Figura 20). Además, a través del análisis de los resultados se reveló la presencia de dos especies inmunoreactivas de CB1. De acuerdo con los datos bibliográficos, la banda de 53 kDa observada correspondería a la forma no glicosilada del receptor. Por su parte, la banda de 63 kDa correspondería a una de las especies glicosiladas inactivas conocidas del CB1 (Waksman y col. 1999). Por otro lado, los estudios de inmunohistoquímica mostraron una distribución dispersa de los CB1 en el área preóptica hipotalámica, donde se encuentran las fibras de LHRH, con gran densidad a nivel del 3V (Figura 21). Sin embargo, no se detectó co-localización de CB1 con fibras inmunoreactivas de LHRH, realizando estudios de doble inmunohistoquímica (dato no mostrado).

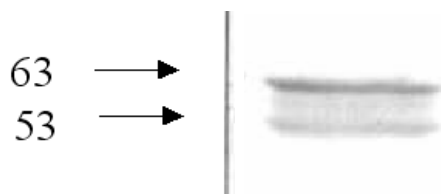


Figura 20. Presencia de CB1 en el HMB. Análisis por Western blot mostrando la presencia de la proteína de CB1 en el HMB de rata macho adulta. La determinación fue repetida 4 veces. 63 y 53 (kDa) representan las dos bandas encontradas con distinto peso molecular.

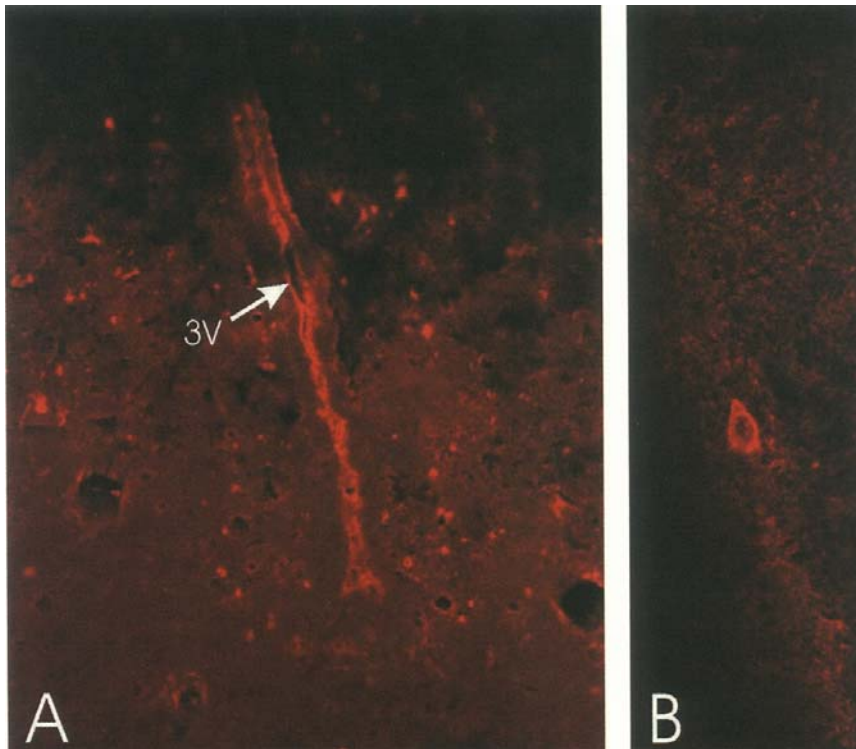


Figura 21. Distribución de los CB1 en el área preóptica hipotalámica.

Sección transversal (20 μm) de hipotálamo de rata macho adulta inmunomarcado con primer anticuerpo anti-CB1 y segundo anticuerpo unido a Rhodamina (rojo) (A) 3V: tercer ventrículo. (B) detalle de una neurona inmunomarcada con anticuerpo anti CB1.

4.3.1.2 Efectos de la anandamida sobre la liberación de LHRH

Una vez corroborada la presencia de los CB1 en el HMB, se procedió a estudiar el efecto *in vitro* de su ligando endógeno más conocido, la anandamida (AEA), sobre la liberación de LHRH y sobre los mediadores más importantes de su liberación. Se comenzó estudiando el efecto de distintas concentraciones de AEA sobre la liberación basal de LHRH para determinar la concentración más efectiva. La concentración de AEA de 10^{-9} M fue la única de las estudiadas que tuvo efecto significativo sobre la liberación hipotalámica basal de LHRH, provocando una inhibición de la misma (Figura 22).

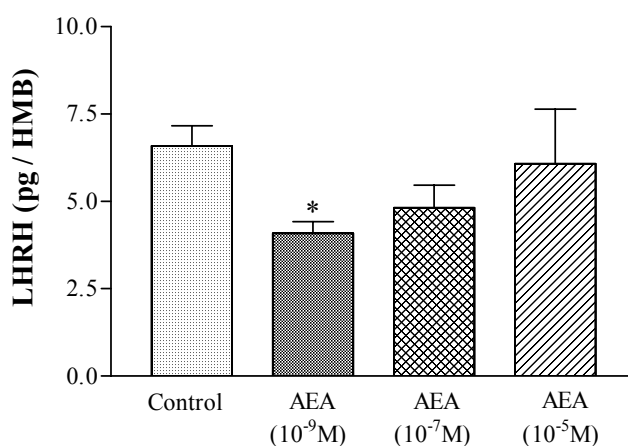


Figura 22. Efecto de distintas concentraciones de la AEA sobre la liberación basal de LHRH.

Los resultados se expresan en pg de LHRH liberados al medio de incubación por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMB. Los experimentos fueron realizados 2 veces. * $p < 0.05$ vs. Control. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Dunnet para comparaciones con el grupo control.

Dada la pequeña magnitud de la inhibición obtenida con la concentración de AEA más efectiva (10^{-9} M), y teniendo en cuenta la dificultad que representa normalmente estudiar los efectos inhibitorios sobre la liberación basal de LHRH, se creyó conveniente estudiar el efecto inhibitorio de la AEA sobre la liberación de LHRH estimulada por distintos

agentes. En primer lugar se determinó el efecto de AEA sobre la liberación de LHRH estimulada por ácido N-metil-D-aspártico (NMDA, 2×10^{-2} M), observándose una inhibición significativa y de mayor magnitud a la obtenida sobre la liberación basal (Figura 23). Además, se observó que el efecto inhibitorio de AEA fue prevenido parcialmente al incubar los HMBs en presencia de AM251 (10^{-5} M), un antagonista selectivo de receptores CB1, evidenciando que el efecto de AEA es mediado al menos en parte a través de estos receptores. Por otro lado, el AM251 no tuvo efecto *per se*, sugiriendo la inexistencia de un tono inhibitorio endógeno de AEA. De todas maneras, este último resultado no es concluyente dado que es muy difícil identificar la presencia de tonos endógenos realizando estudios *in vitro*.

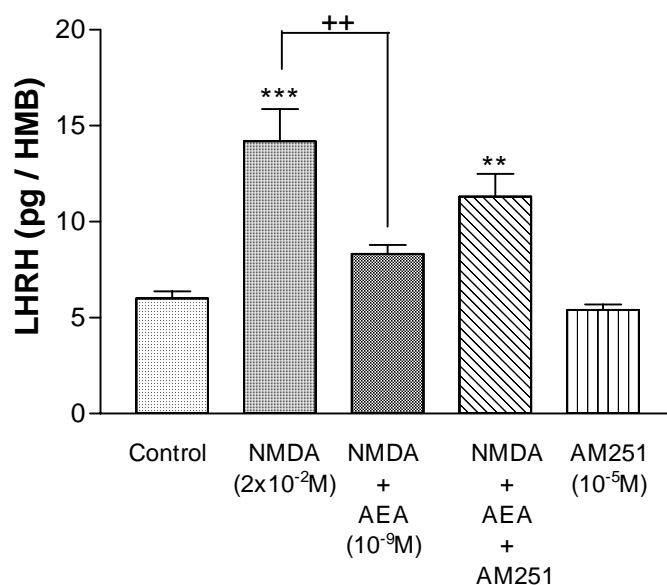


Figura 23. Efecto de AEA sobre la liberación de LHRH estimulada por NMDA. Los resultados se expresan en pg de LHRH liberados al medio de incubación por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMB. Los experimentos fueron realizados 2 veces. **= $p < 0.01$ y ***= $p < 0.001$ vs. Control y += $p < 0.01$ entre los grupos unidos por el conector. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

Habiéndose determinado que el efecto inhibitorio de AEA sobre la liberación de LHRH es mediado al menos en parte a través de receptores CB1, se procedió a estudiar cuales son los mecanismos celulares que se desencadenan luego de la activación de estos receptores. Datos bibliográficos así como comunicaciones personales nos indicaron que los CB1 no están localizados en las neuronas productoras de LHRH. Por lo tanto, es probable que los CB1 estén presentes en terminales nerviosas vecinas a las terminales de LHRH, y que su activación desencadene un mecanismo de regulación paracrina de la liberación del decapeptido por liberación de algún NT, posiblemente inhibitorio. Por lo tanto, procedimos a determinar el efecto de AEA sobre los principales NT inhibitorios implicados en la liberación de LHRH, el GABA y la β -endorfina.

Se realizó una curva dosis-respuesta donde se observó que la concentración de AEA de 10^{-9} M fue la única que estimuló significativamente la liberación del GABA al medio de incubación (Figura 24A). Es probable que el aumento del GABA en el medio de incubación se deba adicionalmente a una inhibición de la recaptación del amino ácido por parte de las neuronas GABAérgicas. Por otro lado, cuando se estudió el efecto de AEA 10^{-9} M sobre la liberación de β -endorfina al medio de incubación, no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 24B).

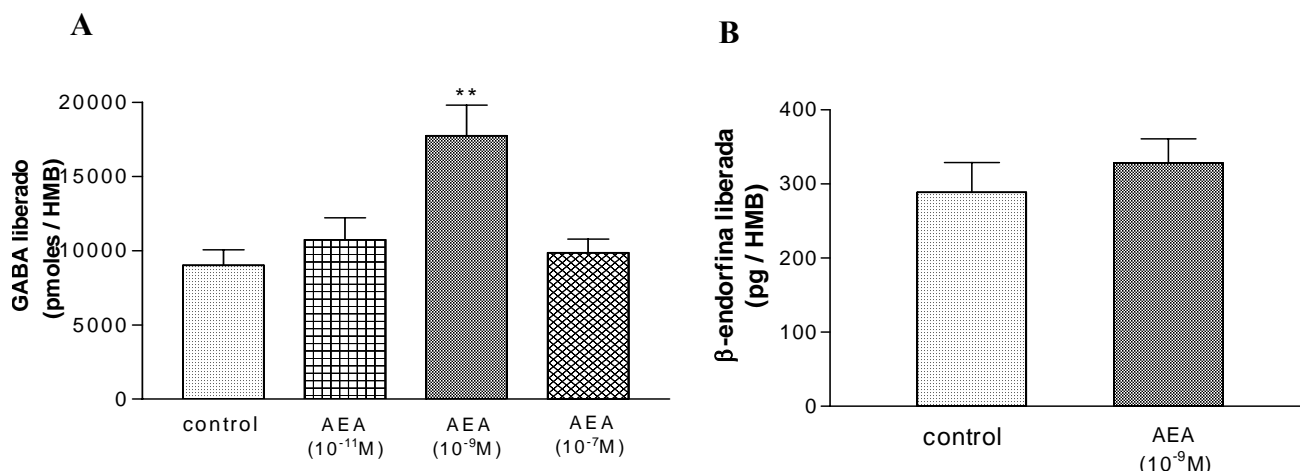


Figura 24. Efecto de AEA sobre la liberación de GABA y de β-endorfina. Los resultados se expresan en pmoles de GABA (A) o pg de β-endorfina (B) liberados al medio de incubación por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media ± SEM de 6-7 HMB. Los experimentos fueron realizados 2 veces. **= $p < 0.01$ vs. Control. Análisis estadístico: A) ANOVA seguida del test de Dunnet para comparaciones con el grupo control, B) Test t de Student.

Una vez determinado el efecto de la AEA como estimulador GABAérgico, y teniendo en cuenta el rol del GABA como NT inhibitorio de la liberación de LHRH, se estudió el efecto de un antagonista específico de receptores GABA_A, la bicuculina, sobre la liberación de LHRH inhibida por AEA. Además, para confirmar si la β-endorfina estaba o no involucrada en la vía inhibitoria de la liberación de LHRH mediada por el sistema endocannabinoide, se estudió el efecto de la naltrexona, un antagonista de receptores opioides (μ , κ , σ , δ), sobre la liberación de LHRH inhibida por AEA. La bicuculina (10^{-4} M) bloqueó completamente la disminución de la liberación de LHRH provocada por AEA, mientras que la naltrexona (10^{-5} M) no modificó tal efecto inhibitorio (Figura 25).

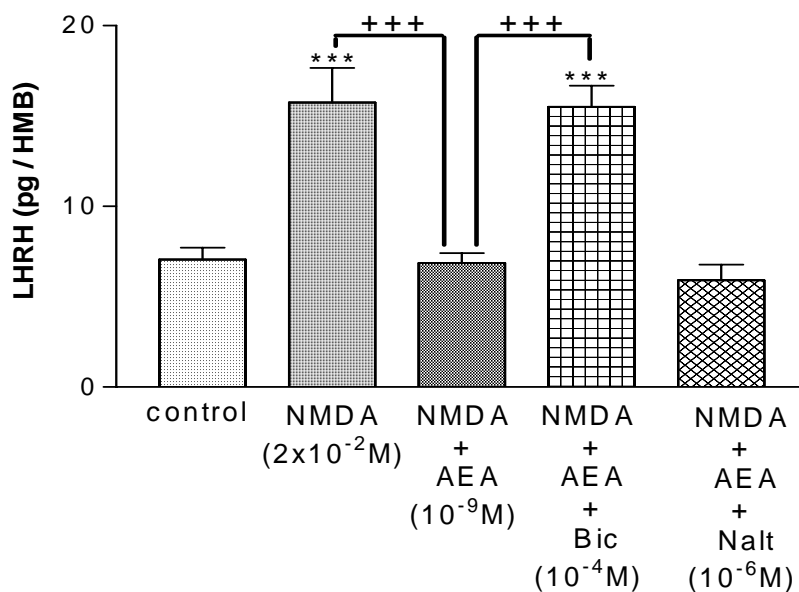


Figura 25. Efecto de bicuculina (Bic) y naltrexona (Nalt) sobre la liberación de LHRH inhibida por AEA. Los resultados se expresan en pg de LHRH liberados al medio de incubación por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMB. Los experimentos fueron realizados 3 veces. ***= $p < 0.001$ vs. Control y +++= $p < 0.001$ vs. NMDA+AEA. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

Es sabido que la mayoría de los receptores de cannabinoides estudiados en los distintos sistemas biológicos se encuentran acoplados a una proteína G inhibitoria y responden inhibiendo la actividad de la enzima adenilato ciclasa con la consecuente inhibición de la producción de AMPc. Por lo tanto, para terminar de confirmar si el efecto de la AEA es mediado a través de estos receptores, se estudió el efecto del endocannabinoide en ausencia y en presencia del antagonista específico de CB1, el AM251, sobre el contenido de AMPc incrementado por FRSK. La AEA (10^{-9} M) disminuyó significativamente el

contenido de AMPc estimulado por FRSK ($8 \times 10^{-5} \text{M}$) luego de 30 min de incubación, y este efecto fue bloqueado completamente con el agregado de AM251 (10^{-5}M) (Figura 26). El AM251 incubado solo no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control.

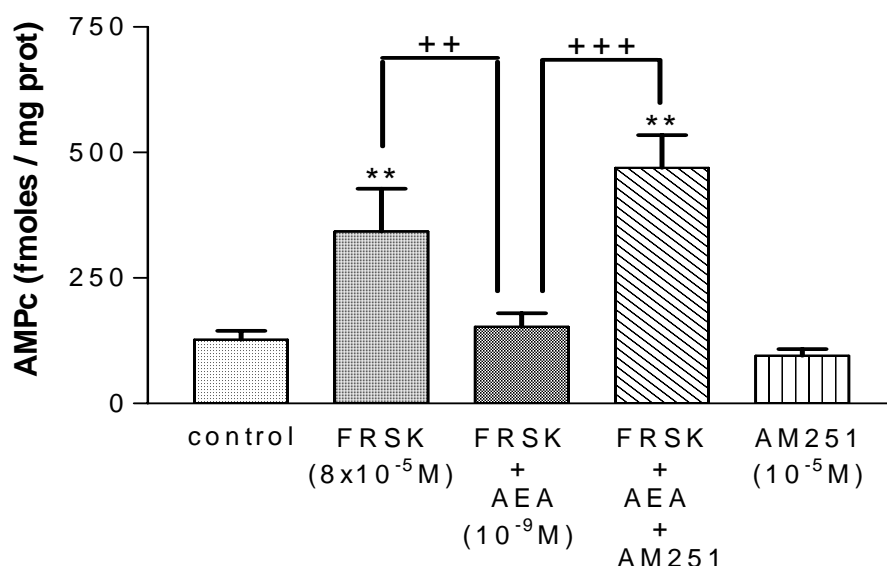


Figura 26. Efecto de la AEA sobre el contenido de AMPc incrementado por FRSK. Los resultados se expresan en fmoles de AMPc por mg de proteína contenidos en los HMBs luego de 30 min de incubación. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMB. Los experimentos fueron realizados 3 veces. **= $p < 0.01$ vs. Control, y $^{++} = p < 0.01$ y $^{+++} = p < 0.001$ vs FRSK + AEA. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

Dado que el AMPc es un segundo mensajero con un papel crucial en la liberación de LHRH, se midió la liberación del neuropéptido utilizando el mismo modelo experimental con el que se determinó el efecto de AEA sobre el contenido del nucleótido cíclico. La FRSK ($8 \times 10^{-5} \text{M}$) incrementó la liberación de LHRH (Figura 27), mientras que la AEA

inhibió significativamente esta liberación. Por su parte, el AM251 (10^{-5} M) bloqueó parcial pero significativamente el efecto inhibitorio de AEA. Estos resultados apoyan la teoría de que la AEA inhibe la liberación de LHRH actuando a través de los receptores CB1, cuya activación involucra una inhibición en la producción de AMPc.

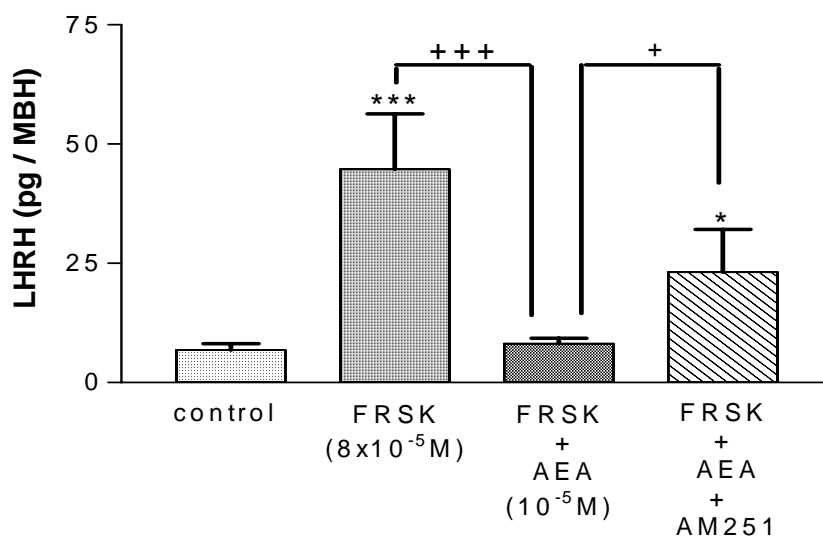
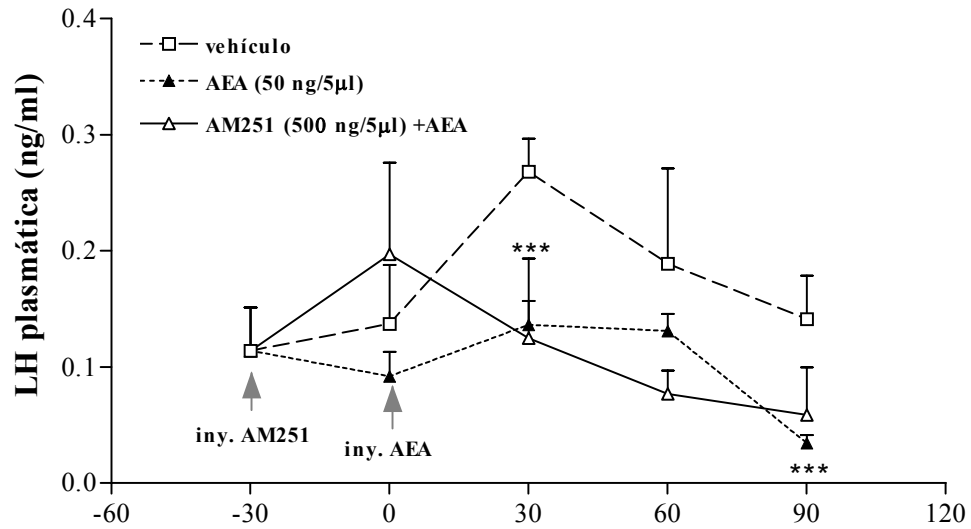


Figura 27. Efecto de la AEA sobre la liberación de LHRH estimulada por FRSK. Los resultados se expresan en pg de LHRH liberados al medio de incubación por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMB. Los experimentos fueron realizados 3 veces. $*$ = $p < 0.05$, $***$ = $p < 0.001$ vs. Control, y $+$ = $p < 0.05$ y $+++$ = $p < 0.001$ vs FRSK + AEA. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

4.3.3 Efectos de la AEA sobre la liberación de LH

Una vez evidenciado, a partir de los experimentos *in vitro*, el efecto inhibitorio de la AEA sobre la liberación de LHRH, se procedió a evaluar su efecto *in vivo* sobre la concentración plasmática de LH. La AEA (50 ng / 5µl), administrada en forma intracerebro-ventrículo lateral (icv) disminuyó el contenido plasmático de LH con respecto a las ratas inyectadas con vehículo (Figura 28 A). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los niveles plasmáticos de LH medidos a los 30 y 90 minutos posteriores a de la inyección de AEA con sus respectivos controles. Contrariamente a lo esperado, la inyección previa de AM251 (500 ng / 5µl por vía icv), no modificó el efecto inhibitorio producido por AEA. Sin embargo cuando la misma dosis de AM251 fue inyectada sola, provocó un incremento significativo en la concentración plasmática de LH con respecto a las ratas que recibieron el vehículo (Figura 28 B). Este último resultado conduce a dos grandes conclusiones, por un lado revela el papel del AM251 como agonista inverso, y por otro deja en claro la presencia de un tono inhibitorio de endocannabinoides que regularía la actividad del eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico.

A



B

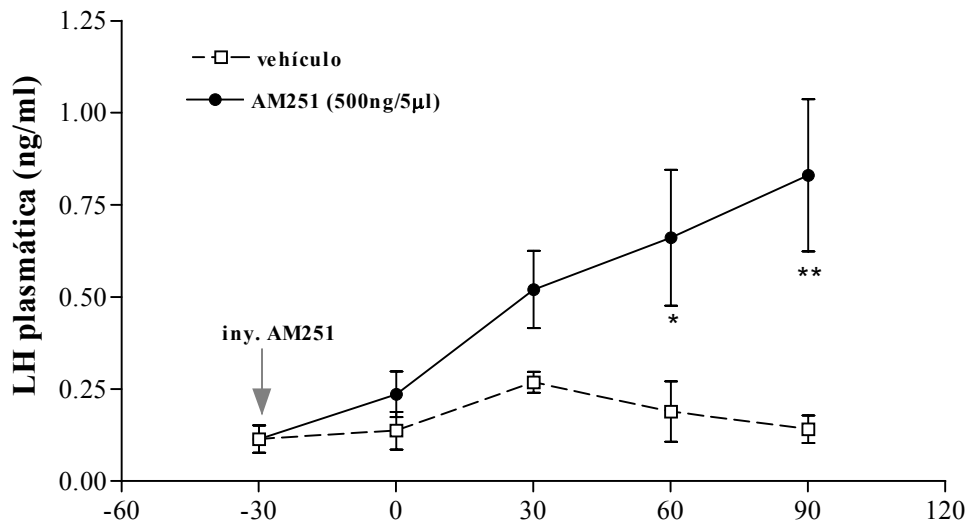


Figura 28. Efecto de la AEA y/o del AM251 inyectados vía icv sobre la concentración plasmática de LH a lo largo del tiempo. Los resultados se expresan en ng de LH / ml de plasma. Las muestras de sangre fueron extraídas a través de una cánula implantada en la vena yugular cada 30 min (curvas en el tiempo). Cada columna representa la media \pm SEM de 7 ratas por grupo. Los experimentos fueron realizados 2 veces. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$ y ***= $p < 0.01$ vs. Control. Los resultados fueron analizados por ANOVA seguido de test Newman Keuls para comparaciones múltiples (A) y test t de Student (B). iny = inyección.

Una vez obtenidos los resultados *in vitro* que evidenciaron el efecto inhibitorio de la AEA sobre la liberación de LHRH y luego de la confirmación de este efecto a través de los experimentos *in vivo*, que mostraron que luego de la inyección icv de AEA disminuye la concentración plasmática de LH, se procedió a evaluar el efecto de AEA sobre la liberación adenohipofisaria de LH. Se realizó una curva dosis respuesta que mostró que 10^{-9} M fue la única concentración de AEA capaz de inhibir significativamente la liberación de LH de adenohipófisis incubadas *in vitro* (Figura 29 A). Luego, se estudió la acción del antagonista específico de CB1, el AM251, sobre el efecto inhibitorio producido por la AEA sobre la liberación de LH, observándose una reversión significativa del mismo (Figura 29 B).

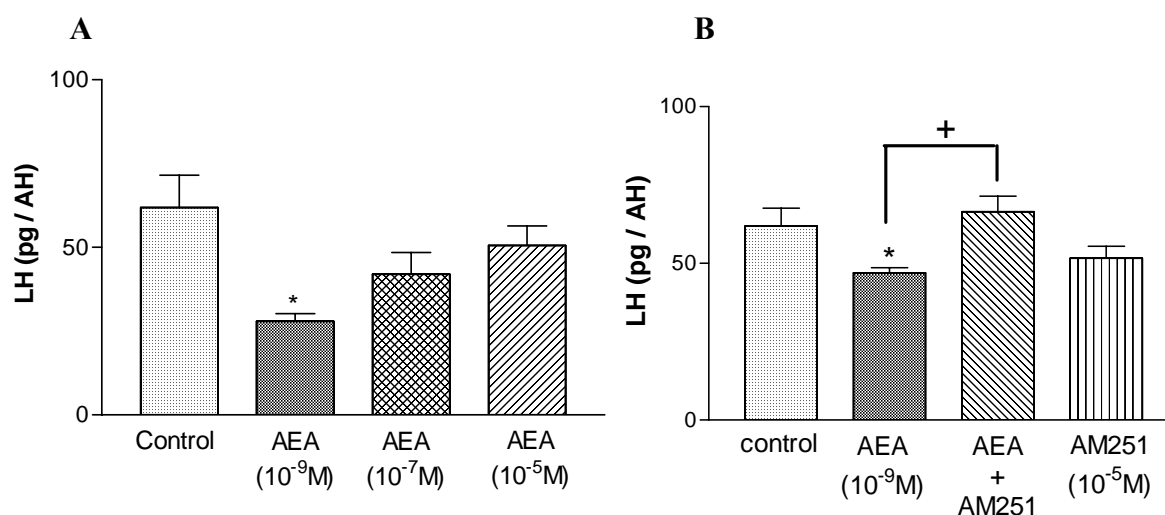


Figura 29. Efecto de AEA sobre la liberación adenohipofisaria de LH. Los resultados se expresan en pg de LH liberados al medio de incubación por adenohipófisis (AH) durante 30 min. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMB. *= $p < 0.05$ vs. Control y += $p < 0.05$ entre grupos unidos por el conector. Los experimentos fueron realizados 2 veces. Análisis estadístico: ANOVA seguida de test de Dunnet para comparaciones con el grupo control (A) o test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples (B).

4.3.4 Conclusiones parciales

- Se corrobora la presencia de los CB1 en el área preóptica hipotalámica.
- La AEA inhibe el eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico actuando sobre los CB1 hipotalámicos cuya activación desencadena la inhibición de la liberación de LHRH, aunque también actúa sobre los CB1 adenohipofisarios inhibiendo directamente la secreción de LH.
- El GABA es el principal NT inhibitorio que media el efecto inhibitorio de la AEA sobre la liberación hipotalámica de LHRH.

4.4 Efectos del EtOH sobre la liberación LHRH. Participación del sistema endocannabinoide.

Como se ha descrito en la introducción, el etanol (EtOH) ejerce un efecto inhibitorio sobre la liberación de LHRH. Experimentos *in vitro* realizados previamente en nuestro laboratorio han demostrado que los HMBs incubados en presencia de EtOH (10^{-1} M) experimentan una disminución en la liberación de LHRH al medio de incubación. Este efecto es mediado a través de incrementos en la liberación de los neurotransmisores inhibitorios GABA y β -endorfina. Si bien los efectos inhibitorios del etanol tienen consenso en la comunidad científica, aún no se han dilucidado los mecanismos que los median. Se hipotetiza acerca de un posible efecto directo del EtOH, independiente de receptores, aunque también se cree que éste podría actuar inespecíficamente sobre distintos tipos de receptores. La presencia de receptores específicos para el EtOH tampoco se descarta, pero aún no se han encontrado evidencias de su existencia. La similitud de los efectos que producen el EtOH y los endocannabinoides sobre el sistema nervioso central así como la similitud en las vías que activan estas sustancias, incluyendo incrementos en la liberación de GABA, nos condujeron a estudiar la posible existencia de fenómenos de modulación del sistema endocannabinoide sobre los efectos del EtOH, en este caso, específicamente sobre la liberación de LHRH. Se observó que, como ocurrió con AEA, el EtOH (10^{-1} M) disminuyó significativamente el contenido de AMPc estimulado por FRSK, así como la liberación de LHRH estimulada por el activador de AC (Figura 30 A y B). El AM251 (10^{-5} M) bloqueó completamente el efecto inhibitorio del EtOH sobre el contenido de AMPc. Sin embargo, el efecto inhibitorio del EtOH sobre la liberación de LHRH fue bloqueado solo parcialmente por el antagonista específico de CB1.

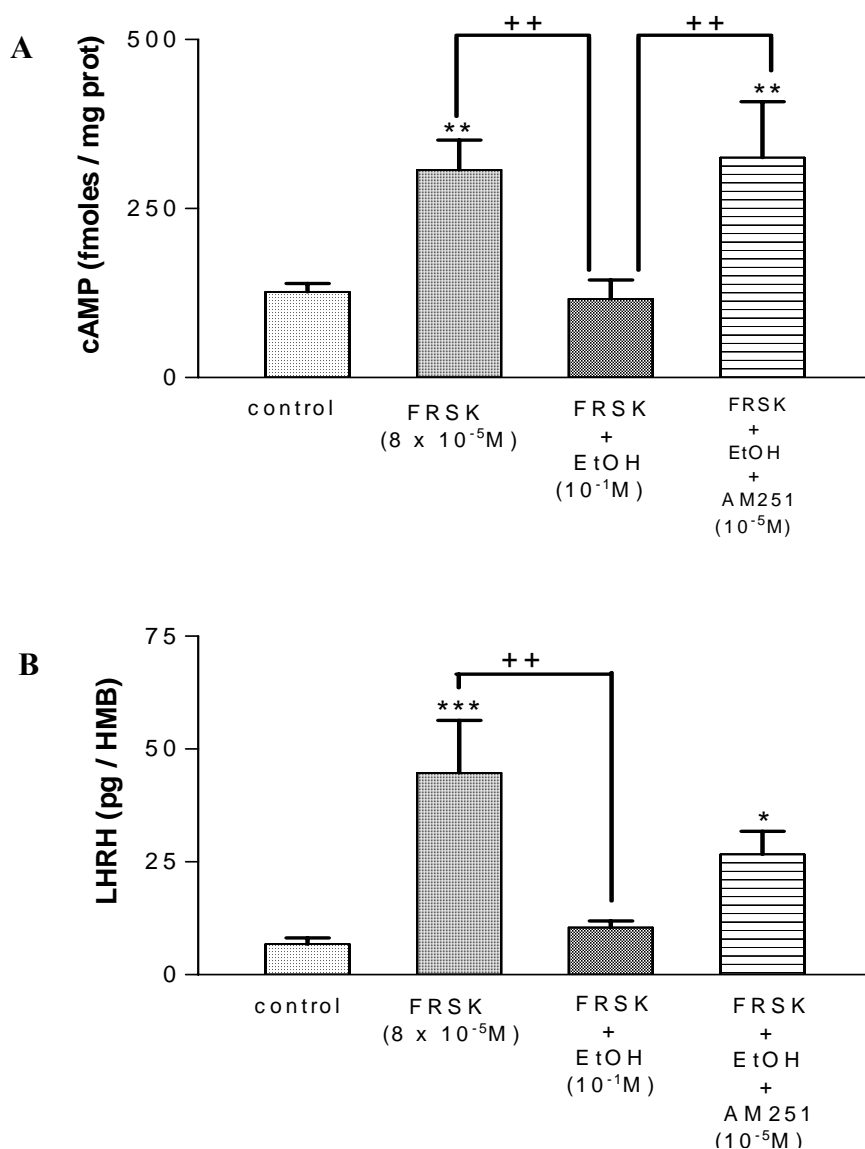


Figura 30. Efecto de la AEA sobre el contenido de AMPc y la liberación de LHRH incrementados por FRSK. (A) Los resultados se expresan en fmoles de AMPc por mg de proteína acumulados en los HMBs luego de 30 min. (B) Los resultados se expresan en pg de LHRH liberados por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMB. Los experimentos fueron realizados 3 veces. **= $p < 0.01$ y ***= $p < 0.001$ vs. Control. ++= $p < 0.01$ entre grupos unidos por el conector. Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

Luego de determinar que el efecto inhibitorio del EtOH sobre la liberación de LHRH es mediado, al menos en parte, a través del sistema endocannabinoide, se evaluaron los efectos del EtOH *in vitro* e *in vivo* sobre la actividad de una enzima que cataliza la producción de AEA, para determinar si el efecto del alcohol es directo o si el mismo actúa incrementando los niveles endógenos de endocannabinoides. Luego de incubar los HMBs en presencia de EtOH (10^{-1} M) durante 30 min, no se detectaron diferencias significativas en la actividad de la AEA sintasa con respecto a los controles (Figura 31A), sugiriendo que el efecto de EtOH sería independiente de los niveles de AEA. Sin embargo los experimentos *in vivo*, mostraron que el EtOH (3g / Kg) inyectado en forma intragástrica produjo incrementos significativos en la actividad de la AEA sintasa medida luego de transcurrir 1 hora de la inyección (Figura 31B), sugiriendo la posibilidad de un efecto inhibitorio adicional del EtOH sobre la liberación de LHRH vía incrementos en la producción de AEA.

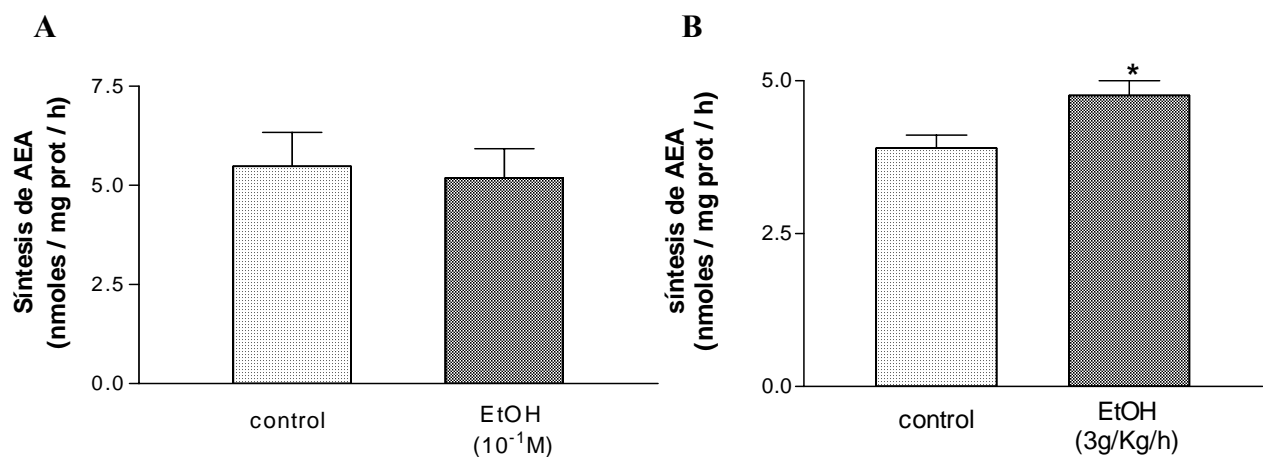


Figura 31. Efectos *in vitro* (A) e *in vivo* (B) del EtOH sobre la actividad de la AEA sintasa.

Los resultados se expresan en nmoles de AEA por mg de proteína por hora. Cada columna representa la media \pm SEM de 8 HMBs. Los experimentos fueron realizados 2 veces. *= $p < 0.05$ vs. Control. Los datos fueron analizados por test t de Student.

4.4.1 Conclusiones parciales

- El EtOH inhibe la liberación de LHRH actuando, al menos en parte, a través del sistema endocannabinoide.
- Aún no es claro si el EtOH tiene un efecto directo sobre los CB1, si actúa incrementando la producción de la AEA, o si produce ambos efectos.

4.5 Efectos del TNF α sobre la liberación de LHRH. Participación del sistema endocannabinoide.

Es conocido que durante la endotoxemia inducida por el LPS, el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal se encuentra inhibido. Al igual que ocurre con los efectos del EtOH, la inhibición desencadenada por el LPS parece involucrar los mismos mediadores que intervienen luego de la activación del sistema endocannabinoide, principalmente la potenciación de la actividad GABAérgica. Por lo tanto, en primer lugar, se determinó la actividad de la enzima hipotalámica que sintetiza AEA, 3 horas después de la inyección intraperitoneal de LPS (5 mg / Kg), observándose un incremento significativo de su actividad (Figura 32A).

El TNF α es una citoquina pro-inflamatoria que aumenta rápidamente luego de la administración del LPS y que además participa de los procesos inflamatorios que tienen lugar en el sistema nervioso central. Por lo tanto, estudiamos el efecto de la inyección icv de TNF α (100 ng / rata) sobre la actividad de la AEA sintasa en HMBs extraídos 3 hs después del tratamiento. Al igual que como ocurrió con el LPS inyectado por vía ip, el TNF α inyectado icv incrementó la actividad de la enzima que sintetiza AEA (Figura 32B).

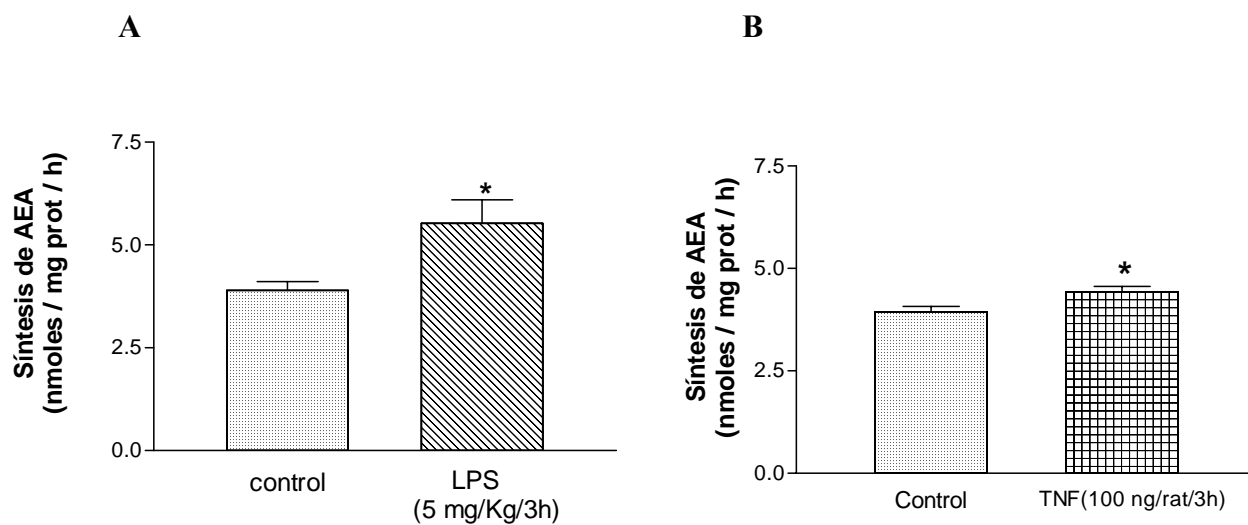


Figura 32. Efectos *in vivo* del LPS inyectado ip (A) y del TNF α inyectado icv (B) sobre la actividad de la AEA sintasa. Los resultados se expresan en nmoles de AEA por mg de proteína por hora. Cada columna representa la media \pm SEM de 8 HMB. Los experimentos fueron realizados 2 veces. *= $p < 0.05$ vs. Control. Los datos fueron analizados por test t de Student.

Una vez observados *in vivo* los efectos estimulatorios del LPS y del TNF α sobre la actividad de la AEA sintasa determinada *ex vivo*, se estudió el efecto *in vitro* del TNF α (2.9×10^{-9} M) sobre la actividad de la enzima, observándose incrementos significativos de la misma (Figura 33 A). Adicionalmente se estudió el efecto del TNF α sobre la liberación basal de LHRH, no registrándose cambios significativos con respecto al grupo control (Figura 33 B).

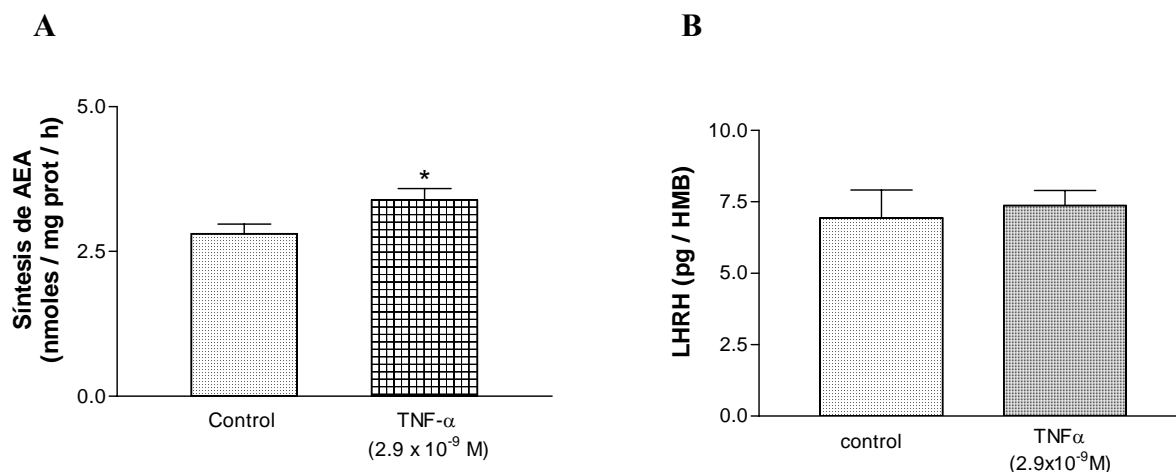


Figura 33. Efectos *in vitro* del TNF α sobre la actividad de la AEA sintasa (A) y sobre la liberación basal de LHRH (B). Los resultados se expresan en nmoles de AEA por mg de proteína por hora (A) o en pg de LHRH liberados por HMB drante 30 min (B). Cada columna representa la media \pm SEM de 8 HMB. Para Los experimentos fueron realizados 2 veces. *= $p < 0.05$ vs. Control. Los datos fueron analizados por test t de Student.

Habiéndose determinado el efecto estimulador del TNF α sobre la actividad de la AEA sintasa se estudió, en primer, lugar el efecto *in vitro* de esta citoquina sobre el contenido de AMPc estimulado por FRSK y luego, con el mismo diseño experimental, su efecto sobre la liberación de LHRH. El TNF α (2.9×10^{-9} M) disminuyó significativamente tanto el contenido de AMPc como la liberación de LHRH incrementados por FRSK (Figura 34 A y B). El AM251 (10^{-5} M) bloqueó significativamente ambos efectos inhibitorios.

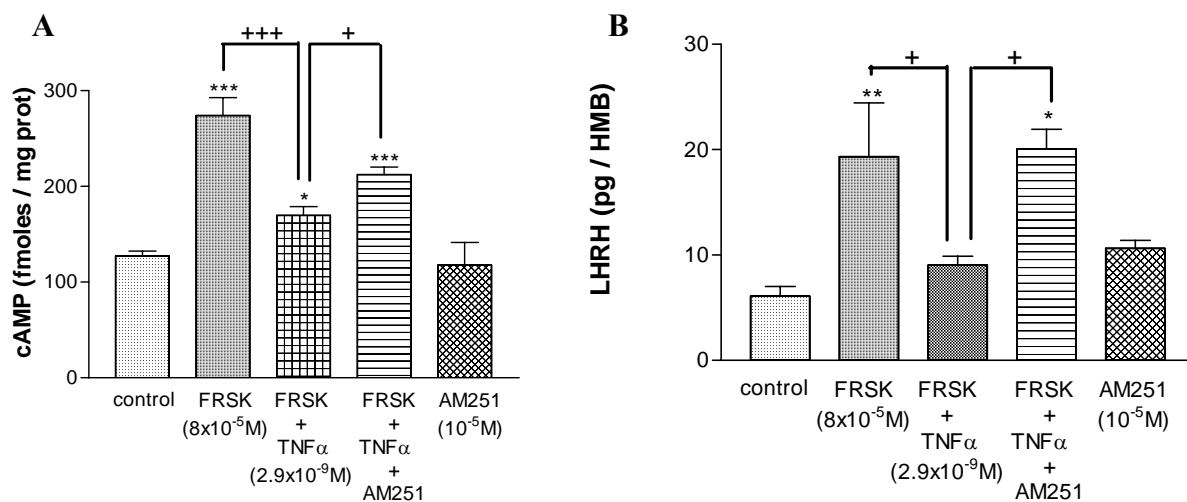


Figura 34. Efecto del TNF α sobre contenido de AMPc (A) y sobre la liberación de LHRH (B) incrementados por FRSK. Los resultados se expresan en fmoles de AMPc por mg de proteína acumulados (A) y pg de LHRH liberados (B) por HMB durante 30 min. Cada columna representa la media \pm SEM de 6-7 HMB. Los experimentos fueron realizados 3 veces. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$ y ***= $p < 0.001$ vs. Control, y += $p < 0.05$ y +++= $p < 0.001$ vs FRSK + TNF α . Los datos fueron analizados por ANOVA seguida del test de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

4.5.1 Conclusiones parciales

- Durante la endotoxemia inducida por el LPS la producción de AEA se encuentra incrementada, posiblemente formando parte de un mecanismo antiinflamatorio e inmuno-protector.
- La liberación de LHRH inhibida por TNF α en situaciones inflamatorias involucra la activación del sistema endocannabinoide.

5.1 Mecanismos involucrados en la liberación de LHRH.

La compleja organización estructural del hipotálamo y la dificultad que implica cultivar las neuronas productoras de LHRH limitan el análisis de las distintas vías de transducción de señales involucradas en la liberación del decapeptido. Algunos investigadores han optado por trabajar con células neuronales de la línea GT1, que producen y secretan LHRH (Mellon y col. 1990). El estudio de monocapas de células GT1 interconectadas en cultivo ha permitido analizar las señales producidas por el Ca^{2+} en este tipo celular y establecer aproximaciones sobre lo que ocurre *in vivo* (Wetsel y col. 1992). Nosotros, para no alejarnos demasiado de lo que ocurre fisiológicamente trabajamos directamente con explantes hipotalámicos que incluyen la EM, incubados *in vitro*, para estudiar los mecanismos involucrados en la liberación de LHRH. Este modelo tiene la ventaja de respetar las interacciones neuronales que tienen lugar *in vivo*. Sin embargo, se introduce la limitación de no poder trabajar a tiempos prolongados, ya que comenzarían a aparecer fenómenos de muerte celular en el tejido.

Existen numerosos reportes en la literatura, que demuestran la presencia de fibras de LHRH en la EM de distintas especies de roedores desde las cuales, el decapeptido es secretado hacia la interfase con los vasos porta-hipofisarios (Jennes y col. 1980, Krey y Silverman 1981, Witkin y col. 1982). En el presente trabajo de tesis se corroboró por técnicas inmunohistoquímicas la presencia de fibras inmunoreactivas a LHRH en la EM de nuestro modelo experimental de rata macho adulta.

A la fecha, no hay certezas acerca de cuales son las verdaderas vías de transducción de señales que conducen a la liberación de LHRH en condiciones fisiológicas. Se ha postulado que el glutamato sería la principal señal estimuladora que desencadena la cascada de señales que conducen a la liberación del decapeptido. El glutamato activa, principalmente, receptores de NMDA localizados en neuronas noradrenérgicas provocando la liberación de NA, que actúa sobre

receptores noradrenérgicos de las neuronas NOérgicas incrementado la producción de NO. El NO, por su parte estimula la actividad de la COX y de la GC, con el consecuente incremento de prostanoïdes y GMPc, respectivamente, que promueven la exocitosis de los gránulos de LHRH (Canteros y col. 1995).

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación indicaron que el nitroprusiato de sodio, un dador NO, estimula la liberación de LHRH en HMBs incubados *in vitro* y que esta acción es bloqueada por el agregado de hemoglobina al medio de incubación (Rettori y col. 1992 y 1993). Además, se demostró que el NO incrementa la biosíntesis de prostanoïdes y su liberación desde HMBs incubados *in vitro*, lo que también contribuye a la liberación de LHRH (Rettori y col. 1992). En ese mismo trabajo, inhibidores de la actividad de la COX como la indometacina y el ácido salicílico bloquearon la liberación de LHRH estimulada por NA, evidenciando que el control de la liberación del decapeptido conducida por el NO, involucra la activación de la COX.

Entre los prostanoïdes sintetizados, el de mayor relevancia con respecto a la liberación de LHRH es la PGE₂. Se ha demostrado que la PGE₂ estimula la liberación de LHRH incrementando la actividad de la AC con el consecuente aumento de la producción de AMPc. Pero según los resultados obtenidos en la presente tesis, la PGE₂, además de estimular la liberación de LHRH vía incrementos en la producción de AMPc, tiene un efecto estimulador adicional independiente del nucleótido, ya que el SQ22536, un inhibidor de la AC, bloqueó solo parcialmente la liberación de LHRH estimulada por la PGE₂ en HMBs incubados *in vitro*. Esta interpretación fue reforzada, dado que los niveles de AMPc no pudieron ser detectados en los HMBs incubados en presencia de PGE₂ junto con SQ22536.

Por otro lado, se ha postulado que el incremento de la producción de GMPc estimulado por NO, conduce a un aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺. Este catión activa la enzima fosfolipasa A₂ provocando la conversión de fosfolípidos de membrana en ácido araquidónico

(AA) en las terminales de LHRH. El AA es convertido en prostanoïdes, por lo cual esta vía reforzaría el efecto estimuladorio de la liberación de LHRH. Sin embargo, también se ha reportado un efecto directo de GMPc sobre la liberación de LHRH independiente de prostaglandinas pero dependiente de Ca^{2+} (Karanth y col. 2004). Concordando con los resultados de Karanth y col., nosotros observamos que un análogo del GMPc, el dbGMPc, fue capaz de estimular la liberación de LHRH en HMBs incubados *in vitro*, no solo a través de la vía que involucra la producción de PGE_2 sino también por una vía independiente del eicosanoïde, dado que el efecto estimuladorio fue revertido solo parcialmente por la indometacina (inhibidor inespecífico de la COX). Además, los niveles de PGE determinados en los HMBs incubados con dbGMP e indometacina estuvieron muy por debajo de los observados en el grupo control. Por lo tanto, el GMPc no solo actuaría como un mensajero temprano, inductor de la formación de AA y del consecuente incremento de la producción de PGE_2 , que conduce a la liberación de LHRH, sino que también lo haría por una vía paralela.

Cuando se estudió la interacción entre nucleótidos cíclicos, se observó que el mbAMPc no modificó el contenido de GMPc en los HMBs incubados durante 30 min. Sin embargo, los HMBs incubados en presencia de dbGMP mostraron una disminución en el contenido de AMPc luego del mismo tiempo de incubación. Este efecto inhibitorio del GMPc sobre la producción de AMPc podría formar parte de un mecanismo de retroalimentación negativa de LHRH sobre su propia liberación, que se describe más adelante.

Por otro lado, si bien es sabido que la PGE_2 incrementa la producción de AMPc, nuestros resultados evidenciaron un efecto inhibitorio del nucleótido cíclico sobre la producción de PGE en HMBs incubados *in vitro*. Sin embargo, en estas condiciones, no se observaron cambios sobre la liberación de la prostaglandina. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de control, ejercido por el AMPc sobre su propia producción, cuyo significado fisiológico podría ser

frenar la liberación de LHRH, ya sea durante la finalización del pulso normal de secreción episódica del decapeptido o en condiciones fisiopatológicas. Se han descrito funciones similares de mensajeros intracelulares para otras vías de transducción de señales. Por ejemplo, se ha demostrado que la PKA estimulada por AMPc no solo tiene un rol importante en la despolarización de membranas vesiculares que conduce a la exocitosis de los gránulos de LHRH, sino que también ejerce una retroalimentación negativa sobre la producción de AMPc (Vitalis y col. 2000).

Más allá de todo lo descrito hasta el momento, existen neurotransmisores que promueven la degradación del fosfatidilinositol disparando una cascada de eventos, que independientemente del AMPc, regulan las funciones celulares (Rasmussen 1984). Un producto clave de esta cascada es el diacilglicerol (DAG), que controla los procesos de fosforilación a través de la activación de una PKC, una quinasa dependiente de fosfolípidos y activada por calcio, que en presencia de DAG se adjunta a membranas y adquiere actividad enzimática (Rasmussen 1984, Nishizuka 1983). El tejido cerebral es particularmente rico en PKC dentro de la fracción sinaptosomal. Además, si bien no se conoce demasiado acerca de las vías de transducción de señales desencadenadas por activación de receptores hipotalámicos de LHRH, es conocido que los receptores de LHRH adenohipofisarios están acoplados a una fosfolipasa C (PLC) y responden incrementando la actividad de PKC. A partir de estas observaciones, se ha postulado que la liberación de LHRH estaría regulada no solo por las vías de PGE₂/AMPc o de GMPc, sino también por mecanismos que involucran la activación de una PKC. De hecho se ha demostrado que los activadores de la PKC como el dictanoilgliocero, un DAG sintético, y la PLC, potencian la liberación de LHRH estimulada por agentes liberadores clásicos como la PGE₂, la NA y la forskolina desde explantes de EM incubados *in vitro* (Ojeda

y col. 1986b). Este mecanismo DAG-dependiente podría desencadenarse durante la autorregulación que ejerce LHRH sobre su propia liberación.

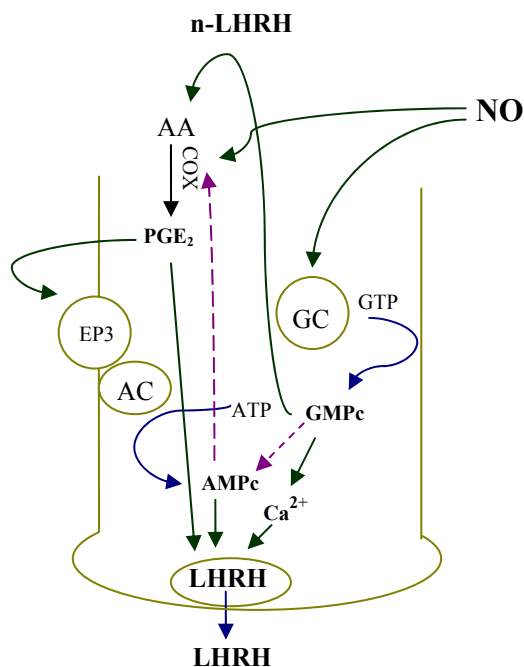


Figura 31. Esquema de las interacciones entre PGE₂, AMPc y GMPc que conducen a la liberación de LHRH. El NO proveniente de neuronas NOérgicas activa las enzimas COX y GC presentes en las neuronas de LHRH desencadenando los mecanismos intraneuronales involucrados en la liberación del neuropéptido. EP3, receptor de PGE₂ acoplado a una proteína Gs; n-LHRH, neurona de LHRH. Las flechas verdes continuas indican efectos estimulatorios, mientras que las flechas violetas discontinuas indican efectos inhibitorios.

5.2 Mecanismos de autorregulación de LHRH

La existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa de trayecto corto en el control de la secreción neuroendocrina fue sugerido inicialmente por Hyypya et al. (Hyypya y col. 1971) en estudios sobre la secreción de FSH. Unos años más tarde, se publicaron resultados que apoyaron la existencia de este mecanismo. La administración icv de somatostatina, un factor inhibitorio de la liberación de la hormona de crecimiento (GH), incrementó la liberación adenohipofisaria de GH, sugiriendo que la somatostatina actuaría sobre las neuronas que la producen suprimiendo su propia liberación a través de un mecanismo de retroalimentación ultra corto (Lumpkin y col. 1981 y 1985). Del mismo modo, se observó que la inyección de LHRH en el tercer ventrículo causó una reducción transitoria de la concentración plasmática de LH (Bedran de Castro y col. 1985), sugiriendo la presencia de un mecanismo de retroalimentación negativa en el control de la liberación del decapeptido. Evidencias más concluyentes fueron aportadas cuando se demostró que los niveles de LHRH en el plasma portal disminuyeron luego de tratar a ratas ovariectomizadas con agonistas de esta neurohormona por vía icv. (Valenca y col. 1987). Además, se ha descrito que LHRH inhibe su propia liberación desde fragmentos de HMB incubados *in vitro* (DePaolo y col. 1987).

La forma en que LHRH ejerce la inhibición de su propia liberación no se ha esclarecido aún. Se ha sugerido que la retroalimentación ocurriría por acción sobre receptores localizados en axones colaterales de las neuronas de LHRH que harían sinapsis sobre las dendritas o sobre el soma de neuronas de LHRH disminuyendo su liberación (Bedran de Castro y col. 1985, DePaolo y col. 1987). De hecho, se han publicado evidencias histológicas de tales conexiones (Kozlowski y col. 1980, Liposits y col. 1984).

Existe evidencia morfológica y molecular de que los receptores de LHRH del SNC no solo se encuentran presentes en la adenohipófisis (Kaiser y col. 1993, Bauer-Dantoin y col.

1993. Smith y Reinhart 1993), sino que también están a nivel hipotalámico (Badr y Pelletier 1987, Jennes y col. 1988, Krsmanovic y col. 1993). Se han descrito terminales de neuronas de LHRH haciendo sinapsis con cuerpos neuronales de LHRH (Leranth y col. 1985). Adicionalmente, se ha demostrado la presencia del RNA mensajero del receptor de LHRH en el HMB, por técnicas de hibridización *in situ* (Jennes y Woolums 1994) y transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Seong y col. 1995).

Estudios realizados con cultivos de neuronas GT1-7 mostraron que la activación de receptores de LHRH por perfusión de agonistas análogos al decapeptido condujo a un incremento transitorio, y dependiente de la concentración, de la liberación de LHRH. Este incremento fue seguido por una disminución de la liberación, por debajo de los valores basales, y de una abolición del patrón episódico de secreción (Krsmanovic y col. 1993). Estos trabajos sugieren que LHRH ejerce un control autocrino y/o paracrino, concentración-dependiente, sobre su propia secreción en neuronas GT1-7 incubadas *in vitro*. De hecho, se observó una disminución en frecuencia y un progresivo incremento en amplitud de los pulsos de LHRH en células expuestas a concentraciones crecientes de agonistas del decapeptido. Además, estos resultados abrieron el debate sobre si LHRH es capaz de afectar la liberación de NTs y otros mensajeros celulares en las neuronas hipotalámicas para modular su propia liberación. Se ha demostrado que un análogo de LHRH, la buserelina, modificó la liberación de los NTs aminoacídicos tanto estimulatorios como inhibitorios desde fragmentos hipotalámicos perfundidos *in vitro*. La liberación del aminoácido inhibitorio, GABA, fue estimulada por la buserelina, mientras que la del estimulatorio, glutamato, se vio inhibida por acción de este análogo de LHRH. En el presente trabajo de tesis se presentan resultados similares a los obtenidos por perfusión con buserelina, es decir incrementos en la liberación del GABA e inhibición de la liberación del glutamato. Sin embargo, en este caso, la droga utilizada fue la

propia LHRH (variante mamífero) y el protocolo experimental consistió en un modelo estático de incubación de HMBs durante 30 min. El aporte novedoso que surge del análisis de nuestros resultados es que el efecto de LHRH sobre los NTs depende de la concentración del decapeptido. Los incrementos en la liberación de GABA fueron observados a bajas concentraciones de LHRH, dentro del rango fisiológico, mientras que la disminución de la liberación del glutamato se observó a las concentraciones más elevadas. Es decir, habría una respuesta diferencial de LHRH sobre los NTs que median su liberación, que sería dependiente de su concentración. Por lo tanto, es probable que existan distintas poblaciones de receptores de LHRH, con distinto umbral, que responden diferencialmente según la concentración del decapeptido y que desencadenan vías de transducción de señales diferentes. Igualmente, todas las concentraciones de LHRH estudiadas conducirían, ya sea por incremento de la liberación del GABA o disminución de la liberación del glutamato, a la inhibición de la liberación de LHRH.

Los resultados de la presente tesis sugieren la presencia de receptores de LHRH en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas hipotalámicas, que formarían parte de una red neuronal autorregulatoria sobre la cual LHRH actuaría para regular su propia liberación. Otros autores han reportado la existencia de una comunicación directa entre los sistemas GABAérgico y glutamatérgico para la regulación de la liberación de LHRH. De hecho, se ha demostrado que la bicuculina, un antagonista específico para receptores GABA_A, bloqueó la liberación de LHRH estimulada por glutamato en fragmentos de núcleo arcuato-eminencia media incubados *in vitro* (Donoso y col. 1992).

No solo se ha demostrado que la buserelina afecta la liberación de los NTs que regulan la liberación de LHRH, sino que también se ha observado su efecto inhibitorio sobre la liberación del decapeptido (Valenca y col. 1987). La reducción del tono estimulador así como

el aumento del tono inhibitorio de los NTs estarían ligados directamente con la inhibición de la liberación de LHRH. Adicionalmente, no debe descartarse un efecto de LHRH, sobre su propia liberación, independiente de NTs, ya que se ha observado que el efecto inhibitorio de la buserelina sobre la liberación de LHRH comienza antes de que se observen cambios en la liberación de los NTs (Feleder y col. 1996). Esta idea, nos llevó a estudiar lo que ocurre con el resto de los mediadores intra e inter-neuronales involucrados en la liberación de LHRH cuando los HMBs son sometidos a distintas concentraciones del dcapeptido. Los HMBs incubados con distintas concentraciones de LHRH, dentro del rango fisiológico, mostraron una inhibición en el contenido de PGE luego de 30 min de incubación. Sin embargo, solo se observó un efecto inhibitorio de pequeña magnitud, y para una sola de las concentraciones de LHRH estudiadas (10^{-9} M), sobre la liberación de la prostaglandina. Por lo tanto es probable que LHRH inhiba la síntesis de PGE₂, uno de los principales mediadores celulares involucrados en su liberación, y que este efecto forme parte de un mecanismo de autorregulación.

Cuando estudiamos el efecto de LHRH sobre los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, profundamente implicados en la liberación de LHRH, se encontraron resultados más difíciles de explicar. El contenido de AMPc se vio incrementado por las concentraciones menores de LHRH estudiadas (10^{-11} y 10^{-9} M), mientras que el contenido de GMPc fue incrementado levemente por la mayor concentración utilizada (10^{-7} M), que también incrementó sutilmente la actividad de la NOS. Si bien estos resultados no concuerdan, en principio, con los mecanismos de retroalimentación negativa de LHRH sobre su propia liberación, hay que tener en cuenta que estos mensajeros son ubicuos y no se midió su contenido en las neuronas de LHRH propiamente dichas, sino en los HMBs enteros, pudiendo estar en exceso en neuronas no implicadas en la liberación de LHRH. Sin embargo, no se puede descartar que el aumento de estos mensajeros tenga algún significado fisiológico sobre la regulación de la retroalimentación

negativa. De hecho, el incremento de la producción de AMPc podría contribuir a mantener bajos los niveles de PGE₂ y por ende contribuir a la inhibición de la liberación de LHRH.

Por otro lado se ha postulado la existencia de un “switch” entre proteínas Gs y Gi que dependería de la concentración de LHRH en el hipotálamo. Esta hipótesis está sustentada por resultados obtenidos a partir de experimentos realizados con cultivos de células hipotálamicas y GT1-7 donde se observó que los tratamientos de 30 min con agonistas de LHRH en concentraciones del orden nanomolar (10⁻⁹M) generaron un incremento en la producción de AMPc, mientras que las concentraciones del orden micromolar (10⁻⁶) disminuyeron el contenido de este nucleótido cíclico con respecto a los controles (Krsmanovic y col. 2001). Además, cuando los tratamientos con busserelina se realizaron en presencia de la toxina de Pertussis, que previene la interacción proteína G-receptor catalizando la ribosilación de ADP de la subunidad α_i, se bloqueó la inhibición de la producción de AMPc (Krsmanovic y col. 2003). La activación de los receptores de LHRH expresados en neuronas GT1-7 condujo a un incremento rápido, y dependiente de la concentración, de los niveles intracelulares de calcio inducido por el inositol trifosfato. La estimulación de la producción del AMPc por concentraciones de LHRH del orden nanomolar se vio inhibida por nifeldipina, un bloqueante de canales de calcio, indicando que las acciones del decapeptido sobre la producción del AMPc son mediadas, al menos en parte, por la entrada de calcio extracelular a través de sus canales.

Se ha descrito que el disparo de potenciales de acción espontáneos en las neuronas de LHRH causa el influjo de calcio y la consecuente activación de la AC para mantener la producción basal de AMPc (Krsmanovic y col. 2001). Adicionalmente, señales convergentes de receptores de LH o de LHRH vía una proteína Gs, conjuntamente con el influjo de calcio, estimulan la producción de AMPc. Estos autores también han sugerido que los cambios en la producción de AMPc en neuronas de LHRH serían secundarios a las alteraciones en la

excitabilidad celular y al influjo de calcio. Este proceso junto con las acciones autocrinas de LHRH sobre la producción de AMPc, podrían contribuir a controlar la secreción pulsátil del neuropeptido. Estas interpretaciones podrían ser la explicación del efecto bifásico de LHRH sobre la producción de AMPc en HMBs incubados *in vitro*. Los incrementos en la producción de NO y GMPc, observados con LHRH 10^{-7} M, podrían formar parte del mecanismo de autorregulación de LHRH sobre su propia liberación. Sin embargo, es posible que estos mensajeros sean incrementados luego de la activación de receptores del decapeptido localizados en neuronas vecinas a las de LHRH, ya que no existen evidencias de la presencia de NOS en las propias neuronas de LHRH.

LHRH 10^{-7} M también incrementó la hidrólisis del fosfatidilinositol en HMBs incubados *in vitro*, sugiriendo la presencia de receptores de LHRH acoplados a PLC que serían activados por altas concentraciones del decapeptido. Es probable que los incrementos en la actividad de la NOS y en la producción de GMPc observados en los HMBs incubados con LHRH 10^{-7} M se deban a la activación de receptores acoplados a PLC. Sin embargo, el papel fisiológico de la activación de esta vía aún se desconoce.

Por otro lado, los cambios observados en la liberación de GABA y glutamato a concentraciones de LHRH de 10^{-9} y 10^{-11} M, sugieren la presencia de, al menos, una población adicional de receptores de LHRH que actúan en forma independiente de PLC.

La naturaleza del mecanismo de liberación pulsátil de LHRH aún no ha sido dilucidada, pero involucraría varias vías para proteger a este componente esencial del control hipotalámico de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias y por ende de la reproducción en general. Vitalis y col. (2000) propusieron que la fosforilación y la inhibición de la AC V y/o VI por la PKA causa una oscilación en la producción de AMPc para activar los canales iónicos dependientes del nucleótido, que incrementan la excitabilidad y promueven la liberación de LHRH. Además,

Sakakibara y col. (1998) propusieron otra vía de retroalimentación negativa en la cual la activación de una PKA dependiente de AMPc estimula la actividad de fosfodiesterasas en neuronas GT1-7.

La relevancia fisiológica del control auto-regulatorio de LHRH *in vivo* no es clara hasta el momento. Podría ser potencialmente importante en la modificación del patrón neurosecretorio pulsátil a uno continuo (surge-like) como el que se observó durante el periodo preovulatorio en cabras hembra (Moenter y col. 1992). Sin embargo, se desconoce su implicancia en la liberación del decapeptido en machos. Además, los efectos continuo y pulsátil que siguen a la exposición de LHRH sobre sus receptores deben ser demostrados.

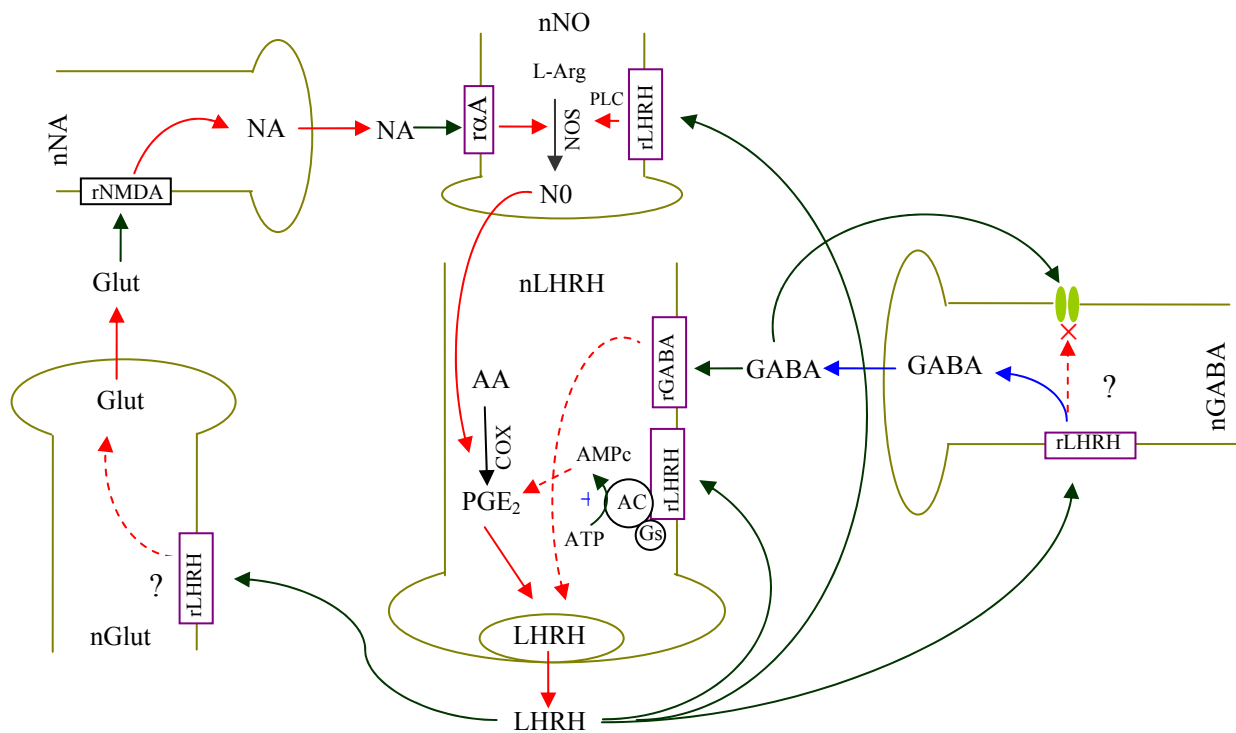


Figura 32. Modelo hipotético de la retroalimentación negativa que ejerce LHRH sobre su propia liberación. Construido a partir de los resultados que se presentan en la tesis sumados a datos bibliográficos. Glut, glutamato; nGlut, neurona glutamatérgica; nLHRH, neurona de LHRH; nGABA, neurona GABAérgica; nNA, neurona Noradrenérgica; nNO, neurona de NO; rLHRH, receptor de LHRH; rGABA, receptor de GABA; rNMDA, receptor de NMDA y glutamato; rαA, receptor α-adrenérgico; ? mecanismo de acción desconocido. Las flechas verdes indican unión al receptor. Las flechas azules indican efectos estimuladores. Las flechas rojas discontinuas indican efectos inhibitorios. Las flechas rojas continuas indican que la vía fue inhibida río arriba.

5.3 Efectos de AEA sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico

En la presente tesis se identificó la presencia del receptor CB1 en el HMB de rata macho adulta por estudios de Western blot. Esta proteína sufre glicosilación en tres sitios potenciales del extremo N terminal (Matsuda y col. 1990), que determinan variaciones en su tamaño. Nuestros estudios evidenciaron una banda de 53 kDa que, según datos bibliográficos, se corresponde en peso molecular con la proteína CB1 no-glicosilada y una banda de 63 kDa que se corresponde con una de las especies glicosiladas (Waksman y col. 1999).

La localización de los CB1 en el SNC ha sido bien descrita por Herkenham y col. (1990 y 1991), quienes encontraron que estos sitios de unión no tienen distribución homogénea. Aunque estos receptores se encuentran en alta densidad en el hipocampo, en los ganglios basales y en el cerebelo, el hipotálamo presenta sitios de unión esparcidos que están levemente aumentados en el núcleo ventromedial (Mailleux y Vanderhaeghen 1992). Estudios de hibridación *in situ* realizados por Herkenham y col. demostraron que los CB1 se localizan en neuronas GABAérgicas del cuerpo estriado (Hohmann y Herkenham 2000) y del hipotálamo (comunicación personal, Herkenham, M.). Por su parte, nuestros estudios de inmunohistoquímica mostraron una distribución dispersa de los CB1 en el área preóptica hipotalámica donde se encuentran las neuronas y las terminales nerviosas de LHRH. A pesar de la amplia distribución hipotalámica de estos receptores, en estudios previos, no observamos co-localización de los mismos con estructuras inmunoreactivas a LHRH mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas (Rettori y col. 2002). Además, Herkenham y col. no observaron, por técnicas de hibridación *in situ*, la presencia del RNA mensajero de CB1 en neuronas de LHRH (comunicación personal Herkenham, M.), sustentando nuestra observación de no co-localización de CB1 y LHRH. Por otro lado, se ha identificado la presencia de

receptores GABA_A en neuronas de LHRH (Spergel y col. 1999, Moragues y col. 2003). Todo lo mencionado anteriormente, nos llevó a plantearnos la posibilidad de que los cannabinoides actúen sobre los CB1 localizados en neuronas vecinas a las de LHRH, probablemente GABAérgicas, que ejercerían un control paracrino inhibitorio de la liberación de LHRH.

Estudios previos, indican que el efecto inhibitorio del THC, el principal principio psicoactivo de la marihuana, sobre el eje reproductivo es ejercido principalmente a nivel hipotalámico, donde produce la inhibición de la liberación de LHRH, conduciendo a la inhibición de la liberación de LH hipofisaria y a la consecuente alteración de la función reproductiva (Ayalon y col. 1977, Wenger y col. 1987). El THC (10^{-11} a 10^{-8} M) no afectó la liberación basal de LHRH desde HMBs incubados *in vitro*. Sin embargo, el THC (10^{-8} M) inhibió la liberación de LHRH estimulada por la NA (5×10^{-5} M) o por la DA (5×10^{-5} M). Además, el THC (10^{-7} M) inhibió la actividad de la COX así como liberación de la PGE₂ de HMBs incubados *in vitro* (Rettori y col. 1990).

En la presente tesis se estudió el efecto del principal ligando endógeno de los CB1, la AEA, sobre la liberación de LHRH en HMBs incubados *in vitro*. En este caso, a diferencia de lo observado con el THC, que solo tuvo efectos inhibitorios sobre la liberación estimulada de LHRH, la AEA inhibió la liberación basal del neuropéptido. Adicionalmente, se observó un efecto inhibitorio de la AEA de mayor magnitud, sobre la liberación de LHRH estimulada por el NMDA o por la forskolina. En ambos casos el efecto inhibitorio de la AEA sobre la liberación de LHRH fue prevenido en gran medida por el antagonista selectivo de los CB1, el AM251, evidenciando la presencia y la acción biológica de estos receptores en la intrincada red de eventos que regulan la liberación del decapeptido en el hipotálamo.

Para confirmar que la AEA actúa a través de los CB1, estudiamos la variación en el contenido de AMPc en HMBs incubados con el endocannabinoide. Es conocido que el

contenido de este nucleótido cíclico disminuye luego de la activación de los CB1, dado que éstos receptores se encuentran acoplados a una proteína Gi y responden inhibiendo la actividad de la enzima AC. Nuestros resultados indicaron que la AEA activa los receptores CB1 en el HMB ya que el contenido de AMPc incrementado por forskolina, un activador de la AC, disminuyó en presencia de AEA y dicha inhibición fue bloqueada completamente por el AM251. Además, este antagonista bloqueó parcialmente la inhibición ejercida por la AEA sobre la liberación hipotalámica de LHRH, corroborando la implicancia de los CB1 como mediadores de este efecto inhibitorio. Este bloqueo parcial provocado por el AM251 es difícil de explicar. Sin embargo, investigaciones recientes, sugieren la presencia de los CB2 en el SNC (Gong y col. 2006), que podrían participar en la inhibición hipotalámica de LHRH ejercida por anandamida. El AM251 tiene muy baja afinidad por los CB2. Por lo tanto, la implicancia de estos receptores en los mecanismos de control de la liberación de LHRH, podría ser una de las causas que expliquen el bloqueo parcial ejercido por el AM251 sobre la acción de AEA. Adicionalmente, se ha sugerido la presencia de un nuevo tipo de receptor central para cannabinoides, el “CB3” que podría tener alta afinidad por la AEA y no así por el AM251 (Breivogel y col. 2001).

Como mencionamos anteriormente, los CB1 están presentes en neuronas vecinas a las de LHRH, y no en las propias terminales nerviosas de la neurohormona. Por lo cual, nos planteamos la posibilidad de que estos receptores formen parte de un mecanismo paracrino de regulación de la liberación de LHRH. Por lo tanto, nos propusimos determinar cuales son las principales señales transducidas por los CB1 que tienen ingerencia en la inhibición de la liberación de LHRH. El análisis conjunto de todos estos estudios nos sugirió que la inhibición de la secreción de LHRH provocada por los cannabinoides podría estar mediada por cambios a nivel de los NTs involucrados en la liberación del decapeptido. De hecho, existe evidencia de

que los cannabinoides pueden inhibir la liberación pre-sináptica del glutamato en el hipocampo de rata (Shen y col. 1996). Además, se vio que este efecto va de la mano con cambios en la actividad GABAérgica. Adicionalmente, se ha observado que el THC, reduce la re-captación del GABA en el globo pálido, resultando en una potenciación del tono GABAérgico (Maneuf y col. 1996).

Con el objetivo de determinar cuales son los NTs inhibitorios que actuarían luego de la activación del sistema endocannabinoide, en primer lugar, estudiamos el efecto *in vitro* de la AEA sobre la liberación hipotalámica del GABA, observando que el endocannabinoide produjo un efecto estimulador sobre la liberación de este aminoácido. Este resultado concuerda con estudios previos que demostraron que el THC incrementó la producción del GABA en HMBs incubados *in vitro* (de Miguel y col. 1998). Por otro lado, demostramos que la AEA no modificó la liberación hipotalámica de β -endorfina. Estos resultados analizados conjuntamente, sugieren que el GABA, y no así la β -endorfina, estaría involucrado en las respuestas desencadenadas por la activación de los CB1. Más aún, como mencionamos anteriormente, el Dr. Herkenham nos comunicó que demostró la presencia de receptores CB1 en neuronas GABAérgicas.

Para confirmar el efecto de AEA sobre los NTs inhibitorios y la consecuente inhibición del eje reproductivo, se estudió el efecto de la bicuculina, un antagonista GABAérgico, y de la naltrexona, un antagonista opioide, sobre la inhibición producida por AEA sobre la liberación de LHRH estimulada por el NMDA. La bicuculina revirtió el efecto inhibitorio de la AEA mientras que la naltrexona no tuvo efecto, corroborando que el GABA, y no así la β -endorfina, está involucrado en la inhibición de la liberación de LHRH inducida por la AEA.

En resumen, la AEA inhibe la liberación de LHRH actuando, al menos en parte, sobre CB1 localizados en neuronas GABAérgicas donde estimula la liberación de GABA (y/o inhibe

su recaptación), que se une a receptores GABA_A localizados en neuronas de LHRH e inhibe la liberación del dacapéptido.

El Dr. Wenger junto a sus colaboradores demostró que los ratones knock out para CB1 (CB1 -/-) tienen disminuidos los niveles de LH y testosterona, demostrando la importancia del sistema endocannabinoide en la regulación de la función reproductiva. Mas aún, ellos observaron que la AEA suprime la secreción de LH y de testosterona en animales normales (CB1 +/+) y no así en animales CB1 -/- (Wenger y col. 2001).

Nuestros estudios *in vivo* demostraron que la inyección icv de AEA disminuyó significativamente los niveles plasmáticos de LH en ratas macho. Estos resultados concuerdan con otros trabajos que indican que el THC inyectado vía intraperitoneal disminuye los niveles séricos de LH en ratas macho (Fernández-Ruiz y col. 1997). Por otro lado, con nuestro grupo de trabajo, demostramos previamente que la AEA no tuvo efectos significativos sobre la liberación de LHRH de HMBs provenientes de ratas hembra ovariectomizadas incubados *in vitro*. (Scorticati y col. 2004). Sin embargo, la administración icv del endocannabinoide disminuyó los niveles plasmáticos de LH en ratas con ablación ovárica bilateral. Por lo tanto, nos planteamos la posibilidad de que los endocannabinoides actúen adicionalmente sobre receptores en los gonadotropos adenohipofisarios provocando la disminución de los niveles plasmáticos de LH. Además, se han realizado estudios inmunohistoquímicos que demostraron la presencia de los CB1 en la adenohipófisis de rata (Wenger y col. 1999).

El efecto estimulador del AM251 que observamos sobre los niveles plasmáticos de LH en ratas macho puede tener distintas interpretaciones: puede deberse a un bloqueo del efecto inhibitorio tónico de la AEA sobre la liberación de LHRH o bien, el AM251 *per se* podría actuar como un agonista inverso de CB1, probablemente reduciendo la actividad de estos receptores (Pertwee y Ross 2002, Sim-Selley y col. 2001, Bouaboula y col. 1997). Sin

embargo, el efecto estimulador del AM251 fue bloqueado por la AEA exógena, resultando en un descenso de los niveles plasmáticos de LH hacia los valores basales. Concordando con nuestros resultados, se ha descrito que el THC inyectado en forma intraperitoneal disminuyó los niveles plasmáticos de LH en ratas macho sacrificadas 1 hora después del tratamiento, mientras que el SR141716A, un análogo estructural del AM251, inyectado por la misma vía los incrementó. Sin embargo, el agregado conjunto de SR141716A y THC no modificó los niveles plasmáticos de LH (de Miguel de col. 1998).

Nuestros estudios *in vitro* demostraron que la liberación de LH desde la adenohipófisis se vio disminuida al incubar las glándulas en presencia de AEA. Este efecto inhibitorio se previno totalmente al incubar el tejido en presencia de AEA y AM251. Por lo tanto, nuestros resultados complementan los estudios inmunohistoquímicos desarrollados por Wenger y col (1999), que demostraron la presencia de los receptores CB1 en la adenohipófisis de ratas macho, ya que confirman la actividad biológica de estos receptores y su acción moduladora de la liberación de LH.

En resumen, la AEA inhibe la liberación adenohipofisaria de LH actuando en los 2 componentes de eje hipotalamo-hipofisogonadotrófico: 1) indirectamente sobre receptores CB1 hipotalámicos, inhibiendo de la liberación de LHRH (Figura 33) y 2) directamente sobre los CB1 en los gonadotropos adenohipofisarios. Es decir, el sistema endocannabinoide controla la liberación de LH actuando tanto a nivel hipotalámico como hipofisario.

5.4 Efectos del EtOH sobre la liberación de LHRH. Participación del sistema endocannabinoide.

Actualmente, el EtOH es considerado una droga psicotrópica como el THC. Existe evidencia de que el alcohol puede afectar la actividad de varios NTs en el SNC. Por lo tanto, sus mecanismos de acción son bastante complejos. La adicción al alcohol, así como a la marihuana, produce numerosos efectos deletéreos en el organismo. Entre estas alteraciones se encuentra la supresión de la reproducción por inhibición de la liberación hipotalámica de LHRH.

Como se ha descrito en párrafos anteriores, la liberación de LHRH no solo está bajo control de NTs estimulatorios como la NA (Rettori y col. 1993) o el ácido glutámico (Rettori y col. 1994), sino que también se encuentra bajo control de NTs inhibitorios como el GABA (Masotto y col. 1989) y la β -endorfina (Lomniczi y col. 2000). La β -endorfina inhibe la liberación de LHRH por estimulación de receptores opiáceos tipo μ localizados en neuronas NOérgicas que conducen a la inhibición de la actividad de la NOS. Además, se ha demostrado que la naltrexona, un antagonista de receptores opiáceos, incrementó la actividad de la NOS en HMBs incubados *in vitro*. Más aún, la β -endorfina bloqueó la acción del NP, un dador de NO, sobre la liberación de PGE_2 y de LHRH (Faletti y col. 1999).

Se ha demostrado que el EtOH aumenta la liberación de β -endorfina que a su vez puede inhibir la liberación de LHRH en forma independiente del GABA, vía inhibición de la NOS. Pero, la β -endorfina también se une a sus receptores en las neuronas GABAérgicas estimulando la liberación del GABA. Dado que la β -endorfina disminuye la actividad de la NOS, mientras que el GABA no tiene efecto sobre la actividad de la enzima, el efecto del EtOH mediado por el GABA sería río abajo de la NOS, bloqueando la activación de la COX (ver Figura 5).

Experimentos realizados por nuestro grupo demostraron que la adición del AA, el sustrato a la COX, no fue capaz de revertir la inhibición de LHRH desencadenada por el EtOH en HMBs incubados *in vitro*, sugiriendo que la acción primaria del alcohol sería, indefectiblemente, la de inhibir la COX (Lomniczi y col. 2000). Más aún, la adición de PGE₂ revirtió el efecto supresor del EtOH sobre la liberación de LHRH. Además, existen evidencias experimentales que indican que el EtOH no solo inhibe la actividad de la COX sino que también disminuye su expresión en el HMB (Canteros y col. 1995).

El EtOH ejerce sus efectos farmacológicos en el SNC por modulación de distintas vías de transducción de señales intracelulares activando receptores de distinto tipo (Basavarajappa y col. 1998). En estudios previos de nuestro grupo de investigación, el EtOH inhibió la liberación de LHRH estimulada por el NMDA en HMBs incubados *in vitro*, incrementando la liberación de GABA y β -endorfina (Lomniczi y col. 2000). En la presente tesis demostramos, con un diseño experimental similar, que el GABA, y no así la β -endorfina, está involucrado en la inhibición de la liberación de LHRH inducida por la AEA. De hecho, la AEA incrementó la liberación del GABA sin modificar la liberación de la β -endorfina en HMBs incubados *in vitro* (Fernández-Solari y col. 2004). Otros autores han demostrado que el EtOH incrementó el contenido del GABA en HMBs incubados *in vitro* (de Miguel y col. 1998, Noto y Myers 1984). A partir de la similitud en los mecanismos involucrados en la liberación de LHRH desencadenados por el EtOH y por los cannabinoides, surgió la idea de estudiar si el EtOH inhibe la liberación del decapeptido por activación del sistema endocannabinoide.

Para determinar si el EtOH es capaz de activar los receptores hipotalámicos de cannabinoides, estudiamos su efecto sobre el contenido de AMPc en HMBs incubados *in vitro*. El incremento en el contenido de AMPc provocado por forskolina fue reducido por el EtOH y

este efecto inhibitorio fue prevenido por el AM251, el antagonista selectivo de CB1. Estos resultados nos indicaron que los CB1 podrían mediar algún efecto del EtOH en el hipotálamo.

Como se mencionó previamente, en estudios previos, el EtOH incrementó la liberación del GABA e inhibió la liberación de LHRH en HMBs incubados *in vitro*. Por lo tanto nos propusimos estudiar si la inhibición de la liberación de LHRH desencadenada por el EtOH es mediada, al menos en parte, por el sistema endocannabinoide. Los experimentos demostraron que la liberación de LHRH inhibida por el EtOH fue revertida por el AM251. Por lo tanto, un mecanismo adicional a través del cual el EtOH inhibe la liberación hipotalámica de LHRH, que se suma a los ya descritos, tendría lugar a través de la activación de los CB1 (Fernández-Solari y col. 2004).

Nuestras evidencias indican que el EtOH, al igual que la AEA, actúa a través de los CB1 inhibiendo la actividad de la AC y estimulando la actividad GABAérgica que detiene la liberación de LHRH. Sin embargo, la inhibición de la liberación de LHRH desencadenada por el EtOH sería mediada solo en parte, a través de los CB1, ya que el AM251 no la revirtió completamente. Este resultado es totalmente lógico debido a la existencia de al menos una vía inhibitoria adicional activada por EtOH, e independiente de CB1, la del sistema opioide (Lomniczi y col 2000).

Basavarajappa y col. demostraron que la exposición crónica al EtOH incrementa los niveles extracelulares de endocannabinoides en células humanas de neuroblastoma y en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (Basavarajappa y col. 1999, 2000, 2003). Por lo tanto, estudiamos el efecto del EtOH sobre la actividad de AEA sintasa medida luego de incubar los HMBs en presencia del EtOH, para determinar si su efecto sobre los CB1 es directo, o si es mediado por incrementos en la producción de AEA. No se encontraron cambios en la actividad de la AEA sintasa en los HMBs incubados *in vitro* durante 30 min en presencia

de EtOH (10^{-1} M). Nuestro procedimiento experimental constó de una incubación de 30 min, por lo tanto, nuestros resultados no se contraponen con los observados por Basavarajappa y col. donde la exposición crónica al EtOH otorgó mayor tiempo para la activación de la maquinaria de síntesis de AEA.

Sin embargo, cuando estudiamos la exposición *in vivo* al EtOH durante 3 hs, observamos un incremento significativo en la actividad de la AEA sintasa medida *ex vivo*. Por lo tanto, es probable que el EtOH active los CB1 no solo a través de una acción directa, sino también incrementando la síntesis de AEA que luego se acoplaría a sus receptores.

Estos resultados nos permitieron construir el siguiente modelo de los efectos inhibitorios del EtOH sobre la liberación de LHRH mediados por el sistema endocannabinoide: el EtOH activa los CB1 localizados en neuronas GABAérgicas. Esta activación puede ser directa, por un mecanismo desconocido, y/o indirecta, incrementando la producción de endocannabinoides. A continuación, se desencadena la liberación de GABA o la inhibición de su recaptación. El incremento en los niveles de este aminoácido en el espacio presináptico, aumentaría la activación de sus receptores localizados en neuronas de LHRH, que conducen a la inhibición la liberación del decapeptido (Figura 33).

5.5 Efectos de TNF α sobre la liberación de LHRH. Participación del sistema endocannabinoide.

Numerosas evidencias indican que el TNF α , la IL-1 y la IL-6 juegan un papel fundamental durante la inflamación/infección y que están involucrados en la respuesta neuroendocrina al estrés (Besedovsky y Del Rey 1996, McCann y col. 1994). La activación del sistema inmune por el LPS estimula la producción de citoquinas no solo en la periferia sino también en el hipotálamo (Gatti y Bartfai 1993, Buttini y col. 1997). Tanto las citoquinas que acceden al SNC como aquellas producidas localmente afectan la actividad neuronal. Estas citoquinas interactúan con receptores específicos localizados en el hipotálamo, afectando la secreción de hormonas.

En los últimos años se ha observado un incremento en el número de estudios que examinan los efectos de los endocannabinoides sobre la biología de las citoquinas en distintos sistemas celulares (Klein y col. 2000). La AEA, además de modular la respuesta celular a distintas citoquinas, puede incrementar o disminuir la producción de las mismas en diferentes condiciones experimentales. (Molina-Holgado y col. 1998, Berdyshev y col. 1997). Por otro lado, se ha demostrado que el LPS incrementa los niveles de AEA en macrófagos peritoneales de ratón por inducción de su síntesis (Liu y col. 2003). Sin embargo, no se han publicado muchos trabajos acerca del efecto de las citoquinas sobre el sistema endocannabinoide.

Nosotros, en primer lugar, demostramos la conexión entre los sistemas inmune y endocannabinoide a nivel hipotalámico, a partir de la observación de un incremento en la actividad de la AEA sintasa en los HMBs extraídos de ratas inyectadas con LPS (vía ip) o con TNF α (vía icv) con respecto a ratas que recibieron vehículo.

Es conocido que el TNF α es liberado rápidamente luego de la administración de LPS (McCann y col. 2000) y que esta citoquina media una serie de efectos atribuidos a la

administración de la endotoxina sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Más aún, se ha demostrado que la liberación de TNF α inducida por el LPS es controlada por el SNC (Mastronardi y col. 2001). Además, se ha demostrado que el LPS activa mecanismos inhibitorios de la liberación de LHRH similares a los descritos para los cannabinoides, principalmente incrementando la actividad GABAérgica (Feleder y col. 1996). Debido a estos antecedentes, nos planteamos la posibilidad de que el LPS, a través de un incremento de la producción TNF α , inhiba la liberación de LHRH por activación del sistema endocannabinoide. Para confirmar esta hipótesis se midió el efecto del TNF α sobre la liberación de LHRH en HMBs incubados *in vitro*. El TNF α no tuvo efecto sobre la liberación basal de LHRH, sin embargo, redujo significativamente la liberación de LHRH estimulada por la forskolina. Este efecto inhibitorio fue totalmente bloqueado por el AM251, un antagonista selectivo del CB1. Estos resultados sugieren que la inhibición de LHRH que tiene lugar en condiciones inflamatorias es mediada, al menos parcialmente, por el sistema endocannabinoide. La activación de este sistema, tendría lugar por el incremento en los niveles de endocannabinoides en el hipotálamo, inducidos por citoquinas pro-inflamatorias como el TNF α (Figura 33). Esta interpretación, inicialmente sustentada por los incrementos en la actividad de AEA sintasa observados luego de la administración de LPS (vía ip) y de TNF α (vía icv), fue luego corroborada en los experimentos *in vitro*, donde los HMBs incubados en presencia de TNF α durante 30 min, mostraron un incremento significativo en la actividad de la enzima.

Existen trabajos que indican que el LPS conduce a la supresión de la actividad del pulso generador de LHRH a través de un mecanismo que involucra al TNF α . Esta alteración, a su vez, genera modificaciones en el patrón de secreción de LH (Yoo y col. 1997). Sustentando nuestra hipótesis de que la inhibición del eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico en situaciones inflamatorias involucra la activación del sistema endocannabinoide, otros autores han

demostrado que la inyección ip de LPS a cabras macho redujo los niveles plasmáticos de LH (Daniel y col. 2002) tal como nosotros demostramos que ocurre luego de la administración icv de AEA en ratas macho.

En resumen, la inhibición de la liberación de LHRH producida en respuesta a la endotoxemia involucra, al menos en parte, la activación del sistema endocannabinoide. Nuestros resultados nos permitieron construir el siguiente modelo hipotético: el TNF α producido y liberado en respuesta al LPS, incrementa la producción de endocannabinoides que actúan sobre los CB1 localizados en neuronas GABAérgicas, que desencadenan la liberación de GABA (o inhiben su recaptación). Este incremento en los niveles del ácido γ -aminobutírico en el espacio presináptico, aumentaría la activación de los receptores de GABA localizados en neuronas de LHRH, inhibiendo la liberación del dapeptido (Figura 33)

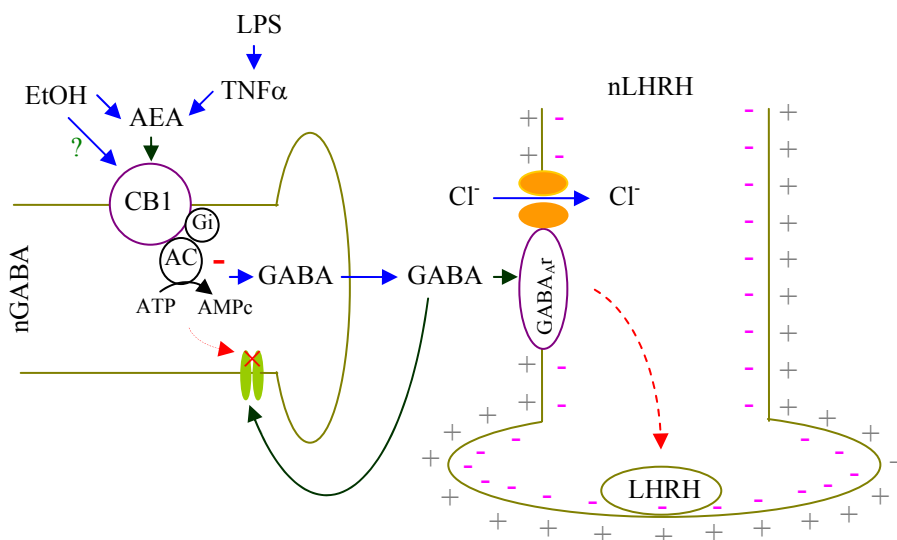


Figura 33. Esquema que resume los mecanismos involucrados en la inhibición de la liberación hipotalámica de LHRH desencadenados por EtOH y LPS por activación del sistema endocannabinoide. Cl⁻, canal de cloruro; nLHRH, neurona de LHRH; nGABA, neurona GABAérgica; +/-, membrana hiperpolarizada. Las flechas verdes continuas indican efectos estimulatorios y las rojas discontinuas, efectos inhibitorios.

6.1 Conclusiones finales

A partir de los resultados del presente trabajo de tesis podemos concluir que la liberación de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) involucra diferentes vías que confieren redundancia a este importante mecanismo que controla la fisiología y el comportamiento reproductivo. Más aún, LHRH modula su propia liberación por un mecanismo de retroalimentación negativa ultra corto. Además, su liberación es inhibida en respuesta a los cannabinoides exógenos y endógenos, al etanol y a los agentes proinflamatorios, provocando la inhibición del eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico. En todos los casos descritos, los mecanismos inhibitorios de la liberación de LHRH son mediados, al menos en parte, por activación del sistema endocannabinoide que actúa como un sistema modulador y probablemente neuroprotector del eje hipotálamo-hipofisogonadotrófico.

- Abraham EJ, Morris-Hardeman JN, Swenson LM, Knoppel EL, Ramanathan B, Wight KJ, Grieger DM, Minton JE (1998) Pituitary function in the acute phase response in domestic farm animals: cytokines, prostaglandins, and secretion of ACTH. *Dom. Anim. Endocrinol.* 15:389-396.
- Ajika K (1979) Simultaneous localization of LHRH and catecholamines in rat hypothalamus. *J. Anat.* 128:331-347.
- Al-Hamood MH, Gilmore DP, Wilson CA (1985) Evidence for a stimulatory beta-adrenergic component in the release of the ovulatory LH surge in pro-oestrous rats. *J. Endocrinol.* 106:143-151.
- Almirez RG, Smith CG, Asch RH (1983) The effects of marijuana extract and delta 9-tetrahydrocannabinol on luteal function in the rhesus monkey. *Fertil. Steril.* 39:212-217.
- Ameri A, Wilhelm A, Simmet T (1999) Effect of the endogenous cannabinoid, anadamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices. *Br. J. Pharmacol.* 126:1831-1839.
- Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R (1971) Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44:205-210.
- Ayalon D, Nir I, Cordova T, Bauminger S, Puder M, Naor Z, Kashi R, Zor U, Harell A, Lindner HR (1977) Acute effect of delta1-tetrahydrocannabinol on the hypothalamo-pituitary-ovarian axis in the rat. *Neuroendocrinology* 23:31-42.
- Badr M, Pelletier G (1987) Characterization and autoradiographic localization of LHRH receptors in the rat brain. *Synapse* 1:567-571.

Basavarajappa BS, Cooper TB, Hungund BL (1998) Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane. *Brain Res.* 793:212-218.

Basavarajappa BS, Hungund BL (1999) Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its precursor N-arachidonoylphosphatidylethanolamine in SK-N-SH cells. *J. Neurochem.* 72:522-528.

Basavarajappa BS, Hungund BL (1999b) Down-regulation of cannabinoid receptor agonist-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding in synaptic plasma membrane from chronic ethanol exposed mouse. *Brain Res.* 815:89-97

Basavarajappa BS, Saito M, Cooper TB, Hungund BL (2000) Stimulation of cannabinoid receptor agonist 2-arachidonylglycerol by chronic ethanol and its modulation by specific neuromodulators in cerebellar granule neurons. *Biochem. Biophys. Acta* 1535:78-86.

Basavarajappa BS, Saito M, Cooper TB, Hungund BL (2003) Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 466:73-83.

Bauer-Dantoin AC, Hollenberg AN, Jameson JL (1993) Dynamic regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in the anterior pituitary gland during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 133:1911-1914.

Bedran de Castro JC, Khorram O, McCann SM (1985) Possible negative ultra-short loop feedback of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in the ovariectomized rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 179:132-135.

- Berdyshev EV, Boichot E, Germain N, Allain N, Anger JP, Lagente V (1997) Influence of fatty acid ethanolamides and delta9-tetrahydrocannabinol on cytokine and arachidonate release by mononuclear cells. *Eur. J. Pharmacol.* 330:231-240.
- Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR (1982) Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem. J.* 206:587-595
- Besedosky H, Del Rey A (1996) Immune-neuroendocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 17: 64-102.
- Beutler B, Poltorak A (2000) Positional cloning of LPS, and the general roll of toll-like receptors in the innate immune response. *Eur. Cytokine Netw.* 11:143-152.
- Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L, Canat X, Rinaldi-Carmona M, Portier M, Barth F, Calandra B, Pecceu F, Lupker J, Maffrand JP, Le Fur G, Casellas P (1997) A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 272:22330-22339.
- Braden TD, Conn PM (1991) The 1990 James A. F. Stevenson Memorial Lecture. Gonadotropin-releasing hormone and its actions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69:445-458.
- Bradford M (1976) A rapid a sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brann DW, Mahesh VB (1994) Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. *Front. Neuroendocrinol.* 15:3-49.

- Bredt DS, Snyder SH (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9030-9033.
- Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:682-685.
- Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol. Pharmacol.* 60:155-163.
- Buttini M, Mir A, Appel K, Wiederhold KH, Limonta S, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW (1997) Lipopolysaccharide induces expression of tumor necrosis factor alpha in rat brain: inhibition by methylprednisolone and by rolipram. *Br. J. Pharmacol.* 122:1483-1489.
- Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D (1996) Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J. Neurosci.* 16:3934-3942.
- Campbell HJ, Feuer G, Harris GW (1964) The effect of intrapituitary infusion of median eminence and other brain extracts on anterior pituitarygonadotrophic secretion. *J. Physiol.* 170:474-486.
- Canteros G, Rettori V, Franchi A, Genaro A, Cebral E, Faletti A, Gimeno M, McCann SM (1995) Ethanol inhibits luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by blocking the response of LHRH neuronal terminals to nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3416-3420.

Canteros G, Rettori V, Genaro A, Suburo A, Gimeno M, McCann SM (1996) Nitric oxide synthase content of hypothalamic explants: increase by norepinephrine and inactivated by NO and cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4246-4250.

Carpenter, MB (1985) *Core text of Neuroanatomy*, Baltimore. USA: Williams & Wilkins.

Chi L, Zhou W, Prikhozhan A, Flanagan C, Davidson JS, Golembo M, Illing N, Millar RP, Sealfon SC (1993) Cloning and characterization of the human GnRH receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* 91:R1-6.

Clayton RN, Popkin RM, Fraser HM (1982) Hypothalamic regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors: effects of gonadotropin-releasing hormone immunoneutralization. *Endocrinology* 110:1116-1122.

Couturier C, Haeffner-Cvaillon N, Croff M, Kazatchkine MD (1991) Binding sites for endotoxins (lipopolysaccharides) on human monocytes. *J. Immunol.* 147:1899-1904.

Crowley WR, Kalra SP (1987) Neuropeptide Y stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamus in vitro: modulation by ovarian hormones. *Neuroendocrinology* 46:97-103.

Daniel JA, Whitlock BK, Wagner CG, Sartin JL (2002) Regulation of the growth hormone and luteinizing hormone response to endotoxin in sheep. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:361-370.

Dees WL, Rettori V, Kozlowski GP, McCann SM (1985) Ethanol and the pulsatile release of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin in ovariectomized rats. *Alcohol* 2:641-646.

De Laurentiis A, Pisera D, Caruso C, Candolfi M, Mohn C, Rettori V, Seilicovich A (2002) Lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-induced changes in prolactin secretion and dopaminergic activity in the hypothalamic-pituitary axis. *Neuroimmunomodulation* 10:30-39.

De Laurentiis A, Pisera D, Lasaga M, Díaz MC, Theas S, Duvilanski B, Seilicovich A (2000) Effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α on GABA release from mediobasal hypothalamus and posterior pituitary. *Neuroimmunomodulation* 7:77-83.

de Miguel R, Romero J, Munoz RM, Garcia-Gil L, Gonzalez S, Villanua MA, Makriyannis A, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (1998) Effects of cannabinoids on prolactin and gonadotrophin secretion: involvement of changes in hypothalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) inputs. *Biochem. Pharmacol.* 56:1331-1338.

DePaolo LV, King RA, Carrillo AJ (1987) In vivo and in vitro examination of an autoregulatory mechanism for luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 120:272-279.

Desarmenien M, Santangelo F, Occhipinti G, Schlichter R, Loeffler JP, Desaulles E, Demeneix BA, Feltz P (1983). Electrophysiological study of GABAA versus GABAB receptors on excitation-secretion coupling. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 37:93-105.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin GI, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.

Donoso AO, Lopez FJ, Negro-Vilar A (1992) Cross-talk between excitatory and inhibitory amino acids in the regulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 131:1559-1561.

Ebisui O, Fukata J, Tominaga T, Murakami N, Kobashashi H, Segawa H, Muro S, Naito Y, Nakai Y, Masui Y, Nishida T, Imura H (1992) Roles of interleukin-1 α and interleukin-1 β in endotoxin-induced suppression of plasma gonadotropin levels in rats. *Endocrinology* 130:3307-3313.

Faletti AG, Mastronardi CA, Lomniczi A, Seilicovich A, Gimeno M, McCann SM, Rettori V (1999) beta-Endorphin blocks luteinizing hormone-releasing hormone release by inhibiting the nitricoxidergic pathway controlling its release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1722-1726.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey KJ, Cullinan GJ, Hunden DC, Johnson DW, Chaney MO, Koppel GA, and Brownstein M (1998) LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284:291-297.

Feleder C, Jarry H, Leonhardt S, Moguilevsky JA, Wuttke W (1996) Effects of endotoxin on in vitro release of LHRH and amino acid neurotransmitters by preoptic mediobasal hypothalamic fragments. *Neuroimmunomodulation* 3:76-81.

Feleder C, Reflojo D, Jarry H, Wuttke W, Moguilevsky J (1996B) Bacterial endotoxin inhibits LHRH secretion following the increased release of hypothalamic GABA levels. Different effects on amino acid neurotransmitter release. *Neuroimmunomodulation* 3:342-351.

Feleder C, Wuttke W, Moguilevsky JA (1998) Hypothalamic relationships between interleukin-6 and LHRH release affected by bacterial endotoxin in adult male rats. Involvement of the inhibitory amino acid system. *Biol. Signals Recept.* 7:7-14.

Fernandez-Ruiz J, Lastres-Becker I, Cabranes A, Gonzalez S, Ramos JA (2002) Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66:257-267.

Fernandez-Ruiz JJ, Munoz RM, Romero J, Villanua MA, Makriyannis A, Ramos JA (1997) Time course of the effects of different cannabimimetics on prolactin and gonadotrophin secretion: evidence for the presence of CB1 receptors in hypothalamic structures and their involvement in the effects of cannabimimetics. *Biochem Pharmacol.* 53:1919-1927.

Fernandez-Solari J, Scorticati C, Mohn C, De Laurentiis A, Billi S, Franchi A, McCann SM, Rettori V (2004) Alcohol inhibits luteinizing hormone-releasing hormone release by activating the endocannabinoid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:3264-3268.

Fink G, Rosie R, Tomos E (1991) Transmisión in the brain. In: *Novel Mechanism for Neural Transmisión*, edited by Fuxe K and Agnate F, New York: Raven Press, p. 195.

Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem. Pharmacol.* 50:1321-1332.

Fride E (2002) Endocannabinoids in the central nervous system--an overview. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 66:221-233.

Gabellec MM, Griffais R, Fillion G, Haour F (1995) Expression of interleukin 1 α , interleukin 1 β and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in mouse brain: regulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment. *Mol. Brain Res.* 31:122-130.

Gaillard RC, Turnill D, Sappino P, Muller AF (1990) Tumor necrosis factor α inhibits the hormonal response of pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinology* 127:101-106.

Gambacciani M, Yen SS, Rasmussen DD (1986) GnRH release from the mediobasal hypothalamus: in vitro inhibition by corticotropin-releasing factor. *Neuroendocrinology* 43:533-536.

Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, and Makriyannis A (1996) 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 307:331-338.

Gatti S, Bartfai T (1993). Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. *Brain Res.* 624:291-294.

Gay VL, Sheth NA (1972) Evidence for a periodic release of LH in castrated male and female rats. *Endocrinology* 90:158-162.

Giguere V, Lefebvre FA, Labrie F (1981) Androgens decrease LHRH binding sites in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 108:350-352.

Giroir BP, Beutler B (1992) Constitutive synthesis of tumor necrosis factor in the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4864-4868.

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 1071:10-23.

Gonzalez S, Cascio MG, Fernandez-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA (2002) Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res.* 954:73-81.

Gothilf Y, Elizur A, Chow M, Chen TT, Zohar Y (1995) Molecular cloning and characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone from the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4:27-35.

Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung MM, Martin BR, and Abood ME (1999) Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 377:117-125.

Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3662-3665.

Harbrecht BG, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR (1995) Cyclic GMP and guanylate cyclase mediate lipopolysaccharide-induced Kupffer cell tumor necrosis factor- α synthesis. *J. Leukoc. Biol.* 57:297-302.

Harms PG, Ojeda SR (1974) A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J. Appl. Physiol.* 36:391-392.

Herkenham M (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections. *NIDA Res. Monogr.* 112:129-145.

Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1932-1936.

Hohmann AG, Herkenham M (2000) Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse* 37:71-80.

Howlett A, and Fleming R (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 26:532-538.

Hyypä M, Motta M, Martini L (1971) 'Ultrashort' feedback control of follicle-stimulating hormone-releasing factor secretion. *Neuroendocrinology* 7:227-235.

Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS (1984) Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: a unifying concept. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 17:267-274.

Jansky L, Vybiral S, Pospíšilová D, Roth J, Dornand J, Zeisberger E, Kmínková J (1995) Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. *Neuroendocrinology* 62:55-61.

Jennes L, Dalati B, Conn PM (1988) Distribution of gonadotropin releasing hormone agonist binding sites in the rat central nervous system. *Brain Res.* 452:156-164.

Jennes L, Stumpf WE (1980) LHRH-systems in the brain of the golden hamster. Cell Tissue Res. 209:239-256.

Jennes L, Stumpf WE, Tappaz ML (1983) Anatomical relationships of dopaminergic and GABAergic systems with the GnRH-systems in the septo-hypothalamic area. Immunohistochemical studies. Exp. Brain Res. 50:91-99.

Jennes L, Woolums S (1994) Localization of gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA in rat brain. Front. Neuroendocrinol. 15:51-77.

Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW (1993) Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. Endocrinology 133:931-934.

Kalra P, Kalra S (1983) Male reproduction and fertility, New York: Raven Press, 1983, p 35.

Kamat A, Yu WH, Rettori V, McCann SM (1995) Glutamic acid induces luteinizing hormone releasing hormone release via alpha receptors. Brain Res. Bull. 37:233-235.

Kang YH, Lee CH, Monroy RL, Dwivedi RS, Odeyale C, Newball HH (1992) Uptake, distribution and fate of bacterial lipopolysaccharides in monocytes and macrophages: an ultrastructural and functional correlation. Electron. Microsc. Rev. 5:381-419.

Karanth S, Yu WH, Mastronardi CA, McCann SM (2004) Inhibition of stimulated ascorbic acid and luteinizing hormone-releasing hormone release by nitric oxide synthase or guanylate cyclase inhibitors. Exp. Biol. Med. 229:72-79.

Karsch FJ, Cummins JT, Thomas GB, Clarke IJ (1987) Steroid feedback inhibition of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biol. Reprod.* 36:1207-1218.

Kingsley TR, Bogdanove EM (1973) Direct feedback of androgens: localized effects of intrapituitary implants of androgens on gonadotrophic cells and hormone stores. *Endocrinology* 93:1398-1409.

Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H (2000) The cannabinoid system and cytokine network. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 225:1-8.

Knobil E (1980) The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent. Prog. Horm. Res.* 36:53-88.

Kozlowski GP, Chu L, Hostetter G, Kerdelhue B (1980) Cellular characteristics of immunolabeled luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neurons. *Peptides* 1:37-46.

Krey LC, Silverman AJ (1981) The luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuronal networks of the guinea pig brain. III. The regulation of cyclic gonadotropin secretion. *Brain Res.* 229:429-444.

Kroncke KD, Fehsel K, Sommer A, Rodriguez ML, Kolb-Bachofen V (1995) Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 376:179-185.

Krsmanovic LZ, Martinez-Fuentes AJ, Arora KK, Mores N, Navarro CE, Chen HC, Stojilkovic SS, Catt KJ (1999) Autocrine regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology* 140:1423-1431.

Krsmanovic LZ, Mores N, Navarro CE, Arora KK, Catt KJ (2003) An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2969-2974.

Krsmanovic LZ, Mores N, Navarro CE, Tomic M, Catt KJ (2001) Regulation of Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclase in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol. Endocrinol.* 15:429-440.

Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Balla T, al-Damluji S, Weiner RI, Catt KJ (1991) Receptors and neurosecretory actions of endothelin in hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11124-11128.

Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Merelli F, Dufour SM, Virmani MA, Catt KJ (1992) Calcium signaling and episodic secretion of gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8462-8466.

Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Mertz LM, Tomic M, Catt KJ (1993) Expression of gonadotropin-releasing hormone receptors and autocrine regulation of neuropeptide release in immortalized hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3908-3912.

Ksontini R, MacKay SLD, Moldawer LL (1998) Revisiting the role of tumor necrosis factor α and the response to surgical injury and inflammation. *Arch. Surg.* 133:558-567.

Kuo PC, Schroeder RA (1995) The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann. Surg.* 221:220-235.

Kuriyama K (1994) Cerebral GABA receptors. *Alcohol Alcohol Suppl.* 2:181-186.

Lan R, Gatley J, Lu Q, Fan P, Fernando SR, Volkow ND, Pertwee R, and Makriyannis A (1999) Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand. *AAPS PharmSci.* 1:E4.

Layé S, Paarnet P, Guoujon E, Dantzer R (1994) Peripheral administration of lipopolisaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain. *Mol. Brain Res.* 27:157-162.

Leonhardt S, Seong JY, Kim K, Thorun Y, Wuttke W, Jarry H (1995) Activation of central GABAA-but not of GABAB-receptors rapidly reduces pituitary LH release and GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 61:655-662.

Leposavic G, Dashwood MR, Ginsburg J, Buckingham JC (1990) Peripubertal changes in the nature of the GnRH response to alpha-adrenoceptor stimulation in vitro and their modulation by testosterone. *Neuroendocrinology* 52:82-89.

Leranth C, Segura LM, Palkovits M, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F (1985) The LH-RH-containing neuronal network in the preoptic area of the rat: demonstration of LH-RH-containing nerve terminals in synaptic contact with LH-RH neurons. *Brain Res.* 345:332-336.

Lichtman AH, Varvel SA, Martin BR (2002) Endocannabinoids in cognition and dependence. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66:269-285.

Liposits Z, Setalo G, Flerko B (1984) Application of the silver-gold intensified 3,3'-diaminobenzidine chromogen to the light and electron microscopic detection of the luteinizing hormone-releasing hormone system of the rat brain. *Neuroscience* 13:513-525.

Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, Gao B, Kunos G (2003) Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 278:45034-45039.

Liu TC, Wang PS, Jackson GL (1981) Effects of GnRH and drugs that affect cAMP levels on LH synthesis and release. *Am. J. Physiol.* 241:E14-21.

Llinas R, Sugimori M, Silver RB (1992) Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256:677-679.

Lomniczi A, Mastronardi C, Faletti A, Seilicovich A, De Laurentiis A, McCann SM and Rettori V (2000) Inhibitory Pathways and the inhibition of luteinizing hormone releasing hormone release by alcohol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2337-2342.

Lopez FJ, Donoso AO, Negro-Vilar A (1992) Endogenous excitatory amino acids and glutamate receptor subtypes involved in the control of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 130:1986-1992.

Lopez FJ, Donoso AO, Negro-Vilar A (1992) Endogenous excitatory amino acids and glutamate receptor subtypes involved in the control of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 130:1986-1992.

Lopez FJ, Negro-Vilar A (1990) Galanin stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion from arcuate nucleus-median eminence fragments in vitro: involvement of an alpha-adrenergic mechanism. *Endocrinology* 127:2431-2436.

Lumpkin MD, Negro-Vilar A, McCann SM (1981) Paradoxical elevation of growth hormone by intraventricular somatostatin: possible ultrashort-loop feedback. *Science* 211:1072-1074.

Lumpkin MD, Samson WK, McCann SM (1985) Effects of intraventricular growth hormone-releasing factor on growth hormone release: further evidence for ultrashort loop feedback. *Endocrinology* 116:2070-2074.

Maccarrone M, De Petrocellis L, Bari M, Fezza F, Salvati S, Di Marzo V, Finazzi-Agro A (2001) Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 393:321-328.

Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48:655-668.

Maneuf YP, Nash JE, Crossman AR, Brotchie JM (1996) Activation of the cannabinoid receptor by delta 9-tetrahydrocannabinol reduces gamma-aminobutyric acid uptake in the globus pallidus. *Eur. J. Pharmacol.* 308:161-164.

Marshal JC, Bourne GA, Fragen MS, Piepes DR (1981) Pituitary gonadotropin releasing hormone receptor. Physiological changes and control receptor number. In: *Functional Correlates of Hormone Receptors in Reproduction*. Edited by Mahesh VB, Muldoon, TG, Saxena BB and Sadler WA, New York: Elsevier, p 93.

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

Martinez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI (1992) Beta 1-adrenergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology* 131:1397-1402.

Masotto C, Wisniewski G, Negro-Vilar A (1989) Different gamma-aminobutyric acid receptor subtypes are involved in the regulation of opiate-dependent and independent luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 125:548-553.

Mastronardi CA, Yu WH, McCann SM (2001) Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha release is controlled by the central nervous system. *Neuroimmunomodulation* 9:148-156.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346:561-564.

Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV (1971) Classic pages in obstetrics and gynecology. Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:1334-1339.

McCann SM, Dhariwal AP (1964) Hypothalamic factors which influence gonadotrophin secretion. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 27:39-44.

McCann SM, Karanth S, Kamat A, Les Dees W, Lyson K, Gimeno M, Rettori V (1994) Induction by cytokines of the pattern of pituitary hormone secretion in infection. *Neuroimmunomodulation* 1:2-13.

McCann SM, Kimura M, Karanth S, Yu WH, Mastronardi CA, Rettori V (2000) The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917:4-18.

McCann SM, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, Yu WH (1998) Hypothalamic control of FSH and LH by FSH-RF, LHRH, cytokines, leptin and nitric oxide. *Neuroimmunomodulation* 5:193-202.

McCann SM, Rettori V (1986) Gamma amino butyric acid (GABA) controls anterior pituitary hormone secretion. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 42:173-189.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 50:83-90.

Mechoulam R, Gaoni Y. Hashish IV (1965) The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron.* 21:1223-1229.

Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5:1-10.

Millhouse, OE (1979) Anatomy of the hypothalamus. In: Handbook of the hypothalamus. Edited by Morgane, G and Panksepp, J. New York: Marcel Dekker, p.221.

Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O (1976) Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.* 251:2629-2636.

Moenter SM, Brand RC, Karsch FJ (1992) Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology* 130:2978-2984.

Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C (1998) The endogenous cannabinoid anandamide potentiates interleukin-6 production by astrocytes infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus by a receptor-mediated pathway. *FEBS Lett.* 433:139-142.

Moragues N, Ciofi P, Lafon P, Tramu G, Garret M (2003) GABAA receptor epsilon subunit expression in identified peptidergic neurons of the rat hypothalamus. *Brain Res.* 967:285-289.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65.

Nadeau S, Riviest S (1999) Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response to different models of systemic immune challenge *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58:61-77.

Nagy E, Berczi I (1978) Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol.* 89:530-537.

Negro-Vilar A, Ojeda SR, McCann SM (1979) Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals in vitro. *Endocrinology* 104:1749-1757.

Nishizuka Y (1983) Calcium, phospholipid turnover and transmembrane signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 302:101-112.

Noto T, Myers RD (1984) In vivo alteration in hypothalamic amino acid synthesis during perfusion of ethanol and morphine in unrestrained rat. *Neurochem. Res.* 9:653-665.

Ohtsuka S, Miyake A, Nishizaki T, Tasaka K, Aono T, Tanizawa O (1987) Substance P stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat hypothalamus in vitro with involvement of oestrogen. *Acta Endocrinol.* 115:247-252.

Ohtsuka S, Miyake A, Nishizaki T, Tasaka K, Tanizawa O (1988) Vasoactive intestinal peptide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat hypothalamus in vitro. *Acta Endocrinol.* 117:399-402.

Ojeda SR, Negro-Vilar A, McCann SM (1979) Release of prostaglandin Es by hypothalamic tissue: evidence for their involvement in catecholamine-induced luteinizing hormone-releasing hormone release. *Endocrinology* 104:617-624.

Ojeda SR, Urbanski HF, Katz KH, Costa ME (1986) Activation of estradiol-positive feedback at puberty: estradiol sensitizes the LHRH-releasing system at two different biochemical steps. *Neuroendocrinology* 43:259-265.

Ojeda SR, Urbanski HF, Katz KH, Costa ME, Conn PM (1986b) Activation of two different but complementary biochemical pathways stimulates release of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4932-4936.

Ortega-Gutierrez S, Hawkins EG, Viso A, Lopez-Rodriguez ML, Cravatt BF (2004) Comparison of anandamide transport in FAAH wild-type and knockout neurons: evidence for contributions by both FAAH and the CB1 receptor to anandamide uptake. *Biochemistry* 43: 8184-8190.

Parhar IS Cell Migration and evolutionary significance of GnRH subtypes (2002) *Prog. Brain Res.* 141:3-17.

Paria BC, Deutsch DD, Dey SK (1996) The uterus is a potential site for anandamide synthesis and hydrolysis: differential profiles of anandamide synthase and hydrolase activities in the mouse uterus during the periimplantation period. *Mol. Reprod. Dev.* 45:183-92.

Paxinos G, Watson C (1997) *The rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic, San Diego).

Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Ashman AJ (1979) in *A Steriotaxic Atlas of the rat Brain* (Plenum, New York), 2nd Ed.

Pertwee R, Griffin G, Fernando S, Li X, Hill A, Makriyannis A (1995) AM630, a competitive cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci.* 56:1949-1955.

Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* 74:129-180.

Pertwee RG, Ross RA (2002) Cannabinoid receptors and their ligands. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 66:101-121.

Pickford, M (1969) The Hypothalamus, Springfield III: Charñes C. Thomas, p 463.

Plötz S, Lentschat A, Behrendt H, Plötz W, Hamann L, Ring J, Rietschel E, Flad H, Ulmer A (2001) The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolisaccharide is CD14 dependent. Blood 97:235-241.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. J. Pharmacol. Exp. Ther. 301:1020-1024.

Rasmussen DD (1993) Episodic gonadotropin-releasing hormone release from the rat isolated median eminence in vitro. Neuroendocrinology 58:511-518.

Rettori V, Aguila MC, Gimeno MF, Franchi AM, McCann SM (1990) In vitro effect of delta-9-tetrahydrocannabinol to stimulate somatostatin release and block that of luteinizing hormone-releasing hormone by suppression of the release of prostaglandin E₂. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:10063-10066

Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM (1993) Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10130-10134.

Rettori V, Canteros G, Renoso R, Gimeno M, McCann SM (1997) Oxytocin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamic explants by releasing nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:2741-2744.

Rettori V, Gimeno M, Lyson K, McCann SM (1992) Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:11543-11546

Rettori V, Gimeno MF, Karara A, Gonzalez MC, McCann SM (1991) Interleukin 1 alpha inhibits prostaglandin E2 release to suppress pulsatile release of luteinizing hormone but not follicle-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2763-2767.

Rettori V, Kamat A, McCann SM (1994) Nitric oxide mediates the stimulation of luteinizing-hormone releasing hormone release induced by glutamic acid in vitro. *Brain Res. Bull.* 33:501-503.

Rettori V, Lomniczi A, Mohn C, Scorticati C, Vissio P, Lasaga M, Franchi A, McCann SM (2002) Mechanism of inhibition of LHRH release by alcohol and cannabinoids. *Prog. Brain Res.* 141:175-181.

Rice AS, Farquhar-Smith WP, Nagy I (2002) Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66:243-256.

Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennis S, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F, Seydel U, Branderburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schobenck U, Flad H-D, Hauschildt S, Schade UF, Di Padova F, Kusumoto S, Schumann RR (1996) Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response and immunological detoxification. En: Current Topics in Microbiology and Immunology, Pathology of Septic Shock. Ed: Rietschel ET, Wagner H. Springer-Verlag (Berlin-Heidelberg). 216:39-81.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Alonso R, Shire D, Congy C, Soubrie P, Breliere JC, Le Fur G (1995) Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. Life Sci. 56:1941-1947.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D, et al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. FEBS Lett. 1994, 350:240-244.

Rink L, Kirchner H (1996) Recent progress in the tumor necrosis factor- α field. Int. Arch. Aller. Immunol. 111:199-209.

Ritchie PK, Ashby M, Knight HH, Judd A (1996) Dopamine increases interleukin 6 and tumor necrosis factor release from rat adrenal zona glomerulosa cells in vitro. Eur. J. Endocrinol. 134:610-616.

Rivier C, Rivest S (1993) Centrally injected interleukin-1 beta inhibits the hypothalamic LHRH secretion and circulating LH levels via prostaglandins in rats. J. Neuroendocrinol. 5:445-450.

Robbins RA, Grisham MB (1997) Nitric oxide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29:857-860.

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

Sakakibara H, Conti M, Weiner RI (1998) Role of phosphodiesterases in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in GT1 cells. *Neuroendocrinology* 68:365-373.

Scorticati C, Fernandez-Solari J, De Laurentiis A, Mohn C, Prestifilippo JP, Lasaga M, Seilicovich A, Billi S, Franchi A, McCann SM, Rettori V (2004) The inhibitory effect of anandamide on luteinizing hormone-releasing hormone secretion is reversed by estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11891-11896.

Seilicovich A, Duvilanski B, Gonzalez NN, Rettori V, Mitridate de Novara A, Maines VM, Fiszer de Plazas S (1985) beta-Endorphin blocks luteinizing hormone-releasing hormone release by inhibiting the nitricoxidergic pathway controlling its release. *Eur. J. Pharmacol.* 111:365-368.

Seilicovich A, Duvilanski BH, Pisera D, Theas S, Gimeno M, Rettori V, McCann SM (1995) Nitric oxide inhibits hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release by releasing gamma-aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3421-3424.

Seong JY, Jarry H, Kuhnemuth S, Leonhardt S, Wuttke W, Kim K (1995) Effect of GABAergic compounds on gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* 136:2587-2593.

Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci.* 16:4322-4334.

Sim-Selley LJ, Brunk LK, Selley DE (2001) Inhibitory effects of SR141716A on G-protein activation in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 414:135-143.

Smith MS, Reinhart J (1993) Changes in pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid content during lactation and after pup removal. *Endocrinology* 133:2080-2084.

Spangelo BL, Judd AM, Call GB, Zumwalt J, Gorospe WC (1995) Role of cytokines in the hypothalamic pituitary-adrenal and gonadal axes. *Neuroimmunomodulation* 2:299-312.

Spergel DJ, Kruth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH (1999) GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J. Neurosci.* 19:2037-2050.

Steiner RA, Bremner WJ, Clifton DK (1982) Regulation of luteinizing hormone pulse frequency and amplitude by testosterone in the adult male rat. *Endocrinology* 111:2055-2061.

Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ (1994) Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr. Rev.* 5:462-499.

Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA, Shepard M (1985) Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230:943-945.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoli K, Yamashita A (1995) 2-arachinoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:89-97.

Szentagothai, J., Hess, B. and Halasz, B (1968) *Hypothalamic control of the Anterior Pituitary: An Experimental-Morphological Study*, Budapest: Akademia Kiado.

Taleisnik S, McCann SM (1961) Effects of hypothalamic lesions on the secretion and storage of hypophysial luteinizing hormone. *Endocrinology* 68:263-272.

Taylor CW, Merritt JE, Putney JW and Rubin RP (1986) Effects of Ca²⁺ on phosphoinositide breakdown in exocrine pancreas. *Biochem. J.* 238:765-772

Terasawa E, Keen KL, Mogi K, Claude P (1999) Pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in cultured LHRH neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. *Endocrinology* 140:1432-1441.

Valenca MM, Johnston CA, Ching M, Negro-Vilar A (1987) Evidence for a negative ultrashort loop feedback mechanism operating on the luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. *Endocrinology* 121:2256-2259.

Vitalis EA, Costantin JL, Tsai PS, Sakakibara H, Paruthiyil S, Iiri T, Martini JF, Taga M, Choi AL, Charles AC, Weiner RI (2000) Role of the cAMP signaling pathway in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in GT1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1861-1866.

Waksman Y, Olson JM, Carlisle SJ, Cabral GA (1999) The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288:1357-1366.

Wang LJ, Brannstrom M, Robertson SA, Norman RJ (1992). Tumor necrosis factor α in the human ovary: presence in follicular fluid and effects on cell proliferation and prostaglandin production. *Fertil. Steril.* 58:934-940.

Wenger T, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA (1999) Immunocytochemical demonstration of CB1 cannabinoid receptors in the anterior lobe of the pituitary gland. *J. Neuroendocrinol.* 11:873-878.

Wenger T, Ledent C, Csernus V, Gerendai I (2001) The central cannabinoid receptor inactivation suppresses endocrine reproductive functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284:363-368.

Wenger T, Rettori V, Snyder GD, Dalterio S, McCann SM (1987) Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on the hypothalamic-pituitary control of luteinizing hormone and follicle-stimulating-hormone secretion in adult male rats. *Neuroendocrinology* 46:488-493

Wetsel WC, Valenca MM, Merchenthaler I, Liposits Z, Lopez FJ, Weiner RI, Mellon PL, Negro-Vilar A (1992) Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4149-4153.

White SA, Kasten TL, Bond CT, Adelman JP, Fernald RD (1995) Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8363-8367.

Whiteside MB, Quan N, Herkenharn M (1999) Induction of pituitary cytokine transcripts by peripheral lipopolysaccharide. *J. Neuroendocrinol.* 11:115-120.

Witkin JW, Paden CM, Silverman AJ (1982) The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology* 35:429-438.

Wray S, Hoffman G (1986) Postnatal morphological changes in rat LHRH neurons correlated with sexual maturation. *Neuroendocrinology* 43:93-97.

Wuttke W, Jarry H, Feleder C, Moguilevsky J, Leonhardt S, Seong JY, Kim K (1996) The neurochemistry of the GnRH pulse generator. *Acta Neurobiol. Exp.* 56:707-713.

Yoo MI-J, Nishihara M, Takahashi M (1997) Tumor necrosis factor- α mediates endotoxin induced suppression of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rat. *Endocr. J.* 44:141-148.

Yoshimoto T, Nakanishi K, Hirose S, Hiroishi K, Okamura H, Takemoto Y, Kanamuru A, Hada T, Tamura T, Kakishita E, Higashino K (1992) High serum IL-6 level reflects susceptible status of the host to endotoxin and IL-1/Tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 148:3596-3603.