



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“Efecto de las Kisspeptinas sobre la expresión y secreción de hormonas en somatolactotropos”

Tesis que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Presenta

la Biól. Angélica Hernández Valdés

Director de Tesis

Dr. Michael Jeziorski

Campus Juriquilla, Querétaro. Octubre 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Angélica Hernández Valdés, cuyo título es: “Efecto de las Kisspeptinas sobre la expresión y secreción de hormonas en somatolactotropos” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. Maricela Luna Muñoz

Secretario (Tutor)

Dr. Michael Conrad Jeziorski

Vocal

Dr. Andrés Quintanar Stephano

Suplente

Dra. Wendy Portillo Martínez

Suplente

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas de nuevo. Al Instituto de Neurobiología, por el enorme aprendizaje que me brindó en estos dos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (Becario No. 268850) cuyo apoyo económico fue indispensable para realizar mis estudios. Del mismo modo agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN201609.

También agradezco al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera por recibirme en su Laboratorio y al Dr. Michael Jeziorski por aceptarme como su alumna.

A la Quim. Leonor Casanova Rico, responsable del área de enseñanza, por su apoyo constante y decidido.

A Antonio Prado Galán, que me dio asistencia en todo momento. A Gabriel Nava Pinto y a Fernando López Barrera por su apoyo en las técnicas de laboratorio y manejo de programas. A Celina García Melendrez, que durante el tiempo en que coincidimos en el laboratorio me brindo su ayuda y consejos. A Diana Caballero Hernández, por ayudarme a entender las técnicas. Así como a Cristina Hernández Martínez y Alberto Briones León quienes compartieron sus conocimientos del laboratorio conmigo.

A la Dra. Carmen Clapp y a la Dra. Carmen Aceves por permitirme usar el equipo de su laboratorio para llevar a cabo mis experimentos. A la Dra. Brenda Anguiano Serrano, y a la Dra. Teresa Morales Guzmán, por apoyarme a lo largo de la maestría con el desarrollo de mi proyecto como parte de mi comité tutorial.

Al Lic. Francisco Javier Valle Valenzuela encargado de la biblioteca y en particular a Román Pacheco Barrita por su asistencia y amabilidad. Al Ing. Ramón Martínez Olvera de la Unidad de Computo.

En general un agradecimiento a todas las personas que integran el equipo de trabajo en los laboratorios A-14 y A-15 con quienes tuve el gusto de trabajar.

Dedicatoria

A mi madre por siempre creer en mí.

A mi hermana, porque sin ella no estaría en ninguna parte.

A mi hermano por no tirar la toalla.

A mi tía Esthela por querer tanto a mi familia y apoyarnos siempre.

A Víctor por traer amor a mi vida.

A mis amigos Héctor, Paulina, Cesar, Enrique y Julio, que aunque a la distancia,
están siempre conmigo.

A Karina y a Bety por su amistad y apoyo a prueba de todo.

A mis roomies Candy y Ximena, y a mi roomie honoraria Irma, por no dejarme
perder cual papalote al viento.

A David, Lenin y Mariana por su compañía y amistad.

Resumen

Las kisspeptinas y su receptor KISS1R, fueron descubiertos a través de su actividad como inhibidores de la metástasis, y ejercen un importante papel como detonadores de la pubertad, a través de la regulación del eje hipotálamo-hipofisis gónadas. Tanto las kisspeptinas como KISS1R se expresan en la hipófisis, por lo que pueden tener efectos in situ, modificando tanto la expresión como la secreción hormonal de sus poblaciones celulares. En este trabajo exploramos si el sistema Kisspeptinas/KISS1R participa en la regulación de prolactina (PRL) y hormona de crecimiento (GH), hormonas liberadas por los lactotropos y somatotropos adenohipofisarios respectivamente. Se utilizaron como modelo de estudio cultivos celulares de la línea GH3 y GH4C1, que secretan tanto PRL como GH y provienen de tumores adenohipofisarios. Los cultivos fueron tratados con distintas concentraciones de Kisspeptina 10 (Kp-10), se llevaron a cabo PCRs de tiempo real para determinar la expresión relativa de PRL y GH, sin encontrar diferencias significativas. También se estimó la cantidad de PRL y GH sintetizada y secretada por las células a 1 y 24 horas después del tratamiento con Kp-10, esto mediante Western blot, con la intención de conocer el tamaño de las hormonas secretadas. En todos los casos encontramos solo la forma común de ambas hormonas 23 y 22 Kda respectivamente y solo encontramos diferencias significativas en la producción de GH en células GH4C1, teniendo un aumento en la concentración de 100 nM. En conclusión no observamos ningún efecto directo, significativo de Kp-10 sobre estos tipos celulares, al menos en cuanto a la expresión génica de PRL y GH en respuesta al tratamiento con Kp-10 ni tampoco observamos una respuesta consistente en cuanto a un posible efecto en su secreción, producción o procesamiento post-transcripcional.

Summary

Kisspeptins and its receptor KISS1R, discovered through their activity as metastasis inhibitors, they also exert an important role as puberty triggers modulating the reproductive axis. Kisspeptins as well as KISS1R are expressed in the hypophysis, which suggests they could have an in situ effect on secretion or gene expression of the hormones produced in certain cell types. Our aim was to explore the probable role of the kisspeptinergic system in the regulation of prolactin (PRL) and growth hormone (GH), which are secreted by the lactotrophs and somatotrophs, respectively. We used GH3 and GH4C1 cell lines which secrete both GH and PRL and are derived from adenohypophyseal tumors. The cell cultures were treated with different concentrations of kisspeptin-10 (Kp-10). Real time PCRs were made from which we obtained the relative quantification of hormone gene expression revealing no significant differences. PRL and GH production and secretion (after 1 hour and 24 hrs of treatment) was measured by western blots, allowing us also to assay the size of the proteins obtained; only the common form of both proteins was found in all experiments. We found significant differences only in the production of GH by GH4C1 cells, showing an increase in the cells treated with the 100nM concentration of Kp-10. In conclusion, we did not observe any direct or meaningful effect of Kp-10 on these two cell lines, at least in terms of PRL and GH gene expression or its production and secretion.

INDICE

Resumen	v
Summary	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PRL y su secreción	2
1.2 GH y su secreción	4
1.3 GH y PRL	4
1.4 Participación de PRL y GH en desarrollo tumoral	5
1.5 Sistema KiSS-1/KISS-1R	6
2. ANTECEDENTES	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVO GENERAL	13
5.1 Objetivos particulares	13
6. MÉTODO	14
6.1 Modelo experimental	14
6.2 Cultivo de células GH3 y GH4C1	14
6.3 Diseño experimental	15
6.4 Extracción, purificación y cuantificación de ARN	15
6.5 PCR de retrotranscripción	16
6.6 PCR	17
6.7 PCR de tiempo real	18
6.8 Medios condicionados y lisados celulares	20
6.9 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	20
6.10 Western blot	21
7. RESULTADOS	22
7.1 Presencia del receptor KISS 1-R	22
7.2 Efecto de Kisspeptinas sobre la expresión de ARNm de PRL y GH	22
7.3 PCR de tiempo real	23
7.4 Efecto de Kp-10 sobre la secreción y producción de PRL y GH en	

	células GH3 y GH4C1	26
	7.4.1 Estimación de proteínas en células GH3	27
	7.4.2 Estimación de proteínas en células GH4C1	31
8	DISCUSIÓN	34
9	REFERENCIAS	39
10	LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	44
11	ANEXOS	45
	Cuadro 1. CTs PRL y Actina por duplicado, células GH3	45
	Cuadro 2. CTs GH y Actina por duplicado, células GH3	45
	Cuadro 3. CTs PRL y Actina por duplicado, células GH4C1	46
	Cuadro 4. CTs GH y Actina por duplicado, células GH4C1	46

1. Introducción

A lo largo de la evolución fue indispensable para los seres vivos poseer sistemas de comunicación entre sus componentes, uno de ellos es el sistema endocrino, cuyo control se lleva a cabo mediante el eje hipotálamo hipofisario, el cual participa en un gran número de procesos fisiológicos a través de la regulación de la liberación de hormonas en las diferentes glándulas endocrinas de los organismos. El hipotálamo integra la información sensorial de otros centros cerebrales y a través de factores de estimulación o inhibición de la liberación hormonal, controla las funciones de los diferentes órganos blanco de las hormonas secretadas por la hipófisis.

En la mayor parte de los vertebrados la hipófisis se divide en tres lóbulos: anterior, intermedio y posterior. El lóbulo anterior, también llamado adenohipofisis (AP), constituye la mayor parte de la masa de la pituitaria y está compuesto por cinco tipos de células endocrinas: tirotropos, lactotropos, corticotropos, somatotropos y gonadotropos, los cuales secretan respectivamente tirotropina (TSH), prolactina (PRL), hormona adenocorticotropa (ACTH), hormona de crecimiento (GH) y gonadotropinas (LH y FSH) (Ooi et al., 2004).

La conexión entre el hipotálamo y la AP se da a través de las arterias hipofisarias superiores que nutren a la eminencia media (EM), región hipotalámica, donde forman el plexo capilar primario. La sangre de este plexo es drenada por las largas venas portales hipofisarias en el plexo secundario, que es una red de capilares de la AP, ambos plexos están formados por capilares fenestrados. Las neurohormonas hipotalámicas son liberadas en el fluido extracelular de la EM cerca de los capilares y son llevadas por el flujo anterógrado del plasma sanguíneo portal a la AP, regulando así la secreción de hormonas adenohipofisarias. También se observa flujo retrógrado en el plexo subependimal, que se conecta por anastomosis con el plexo primario, la función de éste es establecer una reatrolimentación inmediata entre la AP y la EM. Las arterias media e inferior hipofisarias alimentan al tallo pituitario y la hipófisis posterior. Los cortos vasos portales conectan el plexo capilar del lóbulo posterior con la AP,

permitiendo de este modo que se de comunicación paracrina entre estas dos porciones de la hipófisis (Kacsoh, 2000).

Tanto los lactotopos como los somatotopos son muy abundantes en la AP. Los somatotopos, representan entre el 35% y 45% de las células adenohipofisarias. Los lactotopos constituyen entre el 25% y 30% de las células funcionales de esta glándula, y en su mayoría se desarrollan a partir de somatotopos postmitóticos durante la ontogenia. (Larsen et al., 2003).

1.1 PRL y su secreción

La PRL es una hormona polipeptídica de cadena única de entre 197 y 199 aminoácidos en mamíferos. Se encuentra en circulación en varios tamaños: PRL monomérica (23 Kda), PRL dimérica (48 a 56 Kda) y formas poliméricas de más de 100 Kda. La forma monomérica es la más común y la que posee una mayor bioactividad. Las variantes de mayor tamaño son generadas por modificaciones postranscripcionales de la cadena de aminoácidos como por ejemplo la glicosilación, fosforilación y sulfatación. También se pueden encontrar variantes de menor tamaño que se dan como resultado de rupturas proteolíticas (Freeman et al., 2000).

La PRL es liberada de forma episódica con un frecuencia pulsátil de 90 min en XXX, la PRL en plasma sigue un patrón bimodal circadiano con un aumento de amplitud del pulso diurno y uno mayor nocturno, el aumento nocturno se ve asociado con el sueño no REM (Kacsoh, 2000).

La mayoría de la PRL es producida en la hipófisis y aunque no existe un factor liberador específico de PRL hipofisaria, hay varios neuropéptidos que incrementan su liberación, entre ellos la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la oxitocina y la β -endorfina. Del mismo modo, neurotransmisores como la dopamina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) actúan como factores inhibidores de su liberación. La PRL se ha encontrado en numerosas estructuras cerebrales incluyendo la corteza, el hipocampo, la amígdala, el tallo cerebral, cerebelo y medula espinal. A nivel periférico también se

sintetiza en sitios como la placenta, la decidua, las glándulas mamarias y los linfocitos (Méndez et al., 2005).

Los estrógenos han sido considerados como activadores fisiológicos primordiales de la síntesis de PRL y se han visto implicados en la fisiopatología de la hiperprolactinemia y prolactinomas. Prueba de esto es que después de la ovariectomía los niveles hipotalámicos de PRL disminuyen y al administrarse estrógenos de reemplazo éstos se elevan. El 17β -estradiol (E2) estimula la proliferación de lactotopos y activa la expresión del gen de PRL (Adamson et al., 2008).

Los lactotopos muestran una marcada heterogeneidad funcional en respuesta a los secretagogos dependiendo de su localización dentro de la hipófisis: aquéllos que se localizan en la porción exterior del lóbulo anterior son más responsivos a la hormona TRH, potente factor de liberación de PRL, mientras que aquéllos que se encuentran adyacentes al lóbulo intermedio responden más a la dopamina que es el factor de inhibición a PRL mejor descrito (Freeman et al., 2000; Fitzgerald y Dinan, 2008).

La dopamina inhibe la síntesis de PRL hipofisaria mediante la disminución del contenido intracelular de AMP cíclico, cuyo efecto primario se encuentra localizado a nivel de la regulación de la actividad transcripcional de Pit-1. La regulación de la transcripción depende tanto de los receptores expresados como del ambiente intracelular, lo que está directamente relacionado con los factores de transcripción presentes en la célula (Méndez et al., 2005).

La función principal de la PRL se da durante la lactancia. También tiene efectos variados en la glándula mamaria, se encarga de su desarrollo y crecimiento (mamogénesis), de la síntesis de leche (lactogénesis) y del mantenimiento de la secreción de leche (galactopoyesis). La PRL también actúa sobre el cuerpo lúteo, donde su función depende de la especie y la etapa del ciclo hormonal del organismo, en roedores puede ser tanto luteotrófica después del apareamiento como luteolítica en ausencia de este estímulo. Del mismo modo está involucrada en la conducta sexual, induciendo la receptividad de las hembras y el comportamiento parental (Freeman et al., 2000). Además de su participación en el

proceso reproductivo, la PRL juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis al ser un factor regulador del sistema inmune, intervenir en el balance osmótico y en el proceso de angiogénesis (Méndez et al., 2005).

1.2 GH y su secreción

La GH es una hormona polipeptídica de cadena simple cuya forma más común es de 191 aminoácidos, con un peso molecular de 22 kDa que corresponde a la forma madura de la hormona derivada de un precursor de peso molecular de 26 kDa, formas de distinto tamaño pueden ser encontradas tanto en la AP como en circulación, éstas se forman por agregación de moléculas de GH, expresión de formas modificadas de la hormona o ruptura proteolítica de la misma. Como se ha mencionado, se sintetiza en los somatotropos adenohipofisarios, su secreción es controlada por factores hipotalámicos como la hormona liberadora de GH (GHRH) y la ghrelina, las cuales tienen un efecto estimulador; y la somatostatina (SST), que tiene un efecto inhibitorio. En mamíferos se ha descrito que los glucocorticoides y las hormonas tiroideas (TH) también inducen la liberación de GH. La secreción de GH también es modulada por factores ambientales, por ejemplo durante el sueño profundo de ondas lentas se da un pico en la secreción de esta hormona, también el ejercicio y el estrés físico la estimulan. Mientras que, la obesidad, hiperglucemia y la estimulación de receptores β adrenérgicos suprimen su liberación (Larsen et al., 2003).

La GH es más conocida por su papel en procesos como: regulación del crecimiento postnatal, metabolismo energético, expansión y funcionamiento de tejido muscular, y en el sistema inmune (Clapp et al., 2009).

1.3 GH y PRL

Los genes que codifican para GH y PRL derivaron filogenéticamente de un gen ancestral común GH-like y en humanos se encuentran en el cromosoma 17 y en el 6 respectivamente. Los receptores tanto para GH como PRL están cercanamente

asociados en el cromosoma 5. Debido a su homología estructural la GH puede reaccionar de manera cruzada con los receptores de PRL. La expresión génica pituitaria de la GH y PRL está directamente regulada por un factor de transcripción específico de la pituitaria, Pit-1.

La GH y la PRL están funcional y estructuralmente relacionadas. Estas dos hormonas junto con el lactógeno placentario (LP) son proangiogénicas y mediante rupturas proteolíticas son convertidas a péptidos con potentes efectos inhibitorios del crecimiento y función de vasos endoteliales; que suprimen la vasodilatación, angiogénesis y promueven la regresión vascular por medio de apoptosis, por lo cual son nombradas en conjunto como vasohinibinas (Clapp et al., 2009).

1.4 Participación de PRL y GH en desarrollo tumoral

La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes e involucra la remodelación de la matriz extracelular, la migración y proliferación de células endoteliales. El crecimiento de tumores y la metástasis son procesos dependientes de la angiogénesis.

Los prolactinomas son los adenomas hipofisarios más comunes y representan más del 45% de los tumores hipofisarios en la clínica. De acuerdo al tamaño se clasifican en microprolactinomas (<10 mm) y macroprolactinomas (>10 mm), donde los microprolactinomas son significativamente menos vascularizados. Además la densidad de la microvasculatura de los macroprolactinomas invasivos es mayor que la de los no invasivos (Turner et al., 2000).

Tanto la PRL como la GH en su forma más común de 23 y 22 kDa respectivamente, tienen efectos proangiogénicos, sin embargo, los adenomas hipofisarios que las secretan, difícilmente llevan a cabo la metástasis, lo cual resulta contradictorio. Por lo cual resulta importante ahondar en el conocimiento de su papel en la función en esta glándula sin olvidar que ambas hormonas pueden ser convertidas en formas cuyos efectos son vasoinhibitorios, lo cual podría estar

relacionado con la baja tasa de metástasis alcanzada en padecimientos donde estas hormonas son sobre expresadas.

En resumen, la secreción de PRL y GH se ve afectada por una variedad de señales tanto ambientales como del medio interno. Ambas hormonas pueden ser secretadas por una población celular intermedia llamada mamosomatotopos, la cual es bifuncional, predomina en la pituitaria de ratas neonatales y se diferencia a lactotopos en la presencia de estrógenos (Freeman et al., 2000). De hecho, en el caso de la PRL los estímulos fisiológicos más importantes para elevar su secreción en la AP son, la succión, el estrés, y los niveles elevados de estrógenos. El conjunto de estímulos del medio tanto externo como interno son traducidos por el hipotálamo para la subsecuente liberación de factores para su inhibición (PIF) o liberación (PRF). Aunado a la regulación del hipotálamo, también los lactotopos y otras células dentro de la pituitaria liberan factores que intervienen en su regulación, de manera autocrina o paracrina. Es posible que dentro de los factores de regulación se encuentre el sistema kisspeptinérgico del cual se hablará a continuación.

1.5 Sistema KiSS-1/KISS1R

El sistema KiSS-1/KISS1R está principalmente localizado y actúa a través del hipotálamo donde las kisspeptinas operan como transmisores esenciales para la actividad de las neuronas GnRHérgicas en la pubertad y su regulación por señales gonadales y metabólicas a lo largo del ciclo de vida en diferentes especies de mamíferos.

El gen KiSS-1 codifica varios péptidos llamados kisspeptinas capaces de suprimir la metástasis en determinados tipos de tumores. El producto del gen KiSS-1 es una proteína precursora de 145 aminoácidos, que por procesamiento proteolítico genera la metastina de 54 aminoácidos (kp-54), y otros péptidos de menor tamaño con 10, 13 o 14 residuos que forman la familia de las kisspeptinas. Los diez aminoácidos en el extremo carboxilo terminal son comunes a todos los fragmentos

y son también la secuencia mínima para activar al receptor. Todas estas formas son ligandos endógenos de un receptor unido a proteínas G (GPR54) conocido también como KISS1R. Éste se encuentra asociado específicamente a la proteína $G\alpha_q/11$ (Bilban et al., 2004. Ohtaki *et al.*, 2001), la cual a su vez, está acoplada a cascadas de señalización tales como la activación de la fosfolipasa C (PLC), y la subsecuente acumulación de inositol (1,4,5)-trifosfato (IP3), movilización de Ca^{2+} intracelular, y la activación de la proteína cinasa C (Mead et al., 2007).

Se ha demostrado además, que las kisspeptinas también activan rutas relacionadas con proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), especialmente ERK1/2, p38 y fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K)/Akt. De igual forma, la unión de kisspeptina/KISS1R interviene en la señalización celular al interactuar con otros receptores, como el receptor GnRH. El complejo KiSS-1/KISS1R también puede influir en otros eventos de señalización, tales como la inhibición de la expresión de las metaloproteasas de matriz 9 (a través del NF κ B) y de calcineurina (Castaño et al., 2009).

La función medular de las kisspeptinas es la regulación de la liberación de las hormonas gonadotrópicas, ya que actúan directamente sobre las neuronas GnRHérgicas vía el receptor KISS1R, y se les ha propuesto como las mediadoras del asa de retroalimentación de los esteroides sexuales sobre los gonadotropos para la liberación de GnRH. Los estrógenos disminuyen la expresión del gen de las kisspeptinas en el núcleo arcuato y la aumentan en el núcleo anteroventral periventricular del hipotálamo (AVPV) lo que en hembras estimula la liberación de GnRH y por consiguiente de LH requerida para la ovulación (Colledge et al., 2008).

Sin embargo la actividad de las kisspeptinas fue primero descrita en melanomas, por lo cual se ha acumulado una gran cantidad de información acerca de sus efectos en procesos de invasividad y metástasis.

El gen *KiSS-1* está involucrado en el control de la diseminación del cáncer, se ha demostrado que deja de expresarse durante la etapa metastásica de dicho padecimiento, y el aumento en la expresión de ADNc de KiSS-1 en células

cancerosas metastásicas humanas suprimen la metástasis en ratones atímicos (Bilban et al., 2004). Del mismo modo, la activación del receptor KiSS1R en células MDA-MB-435S de humanos lleva a la inhibición de crecimiento celular, reducción de su clonogenicidad, e inducción de muerte celular programada (Becker et. al., 2005). Otro efecto de su activación es la disminución de la proliferación y movilidad celular, también se cree que la metastina (Kp-54) está implicada en el control de la migración de las células trofoblásticas (De Roux et al., 2003).

Por otro lado, se sabe que el trastorno hipofisiario más frecuente es aquel producido por adenomas secretores de PRL. En la pituitaria, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, la vascularización es menor en los adenomas en comparación con la de la glándula normal. Se ha observado que la densidad de la microvasculatura (MVD) es significativamente mayor en carcinomas pituitarios productores de PRL que en los adenomas hipofisarios de la misma naturaleza, y que los macroprolactinomas invasivos están más vascularizados que los no invasivos. La presencia de la metaloproteasa de matriz-9 (MMP-9) así como sus niveles de expresión están relacionados con la invasividad de los tumores en prolactinomas (García de la Torre et al., 2005).

En este punto es importante recordar que la PRL y GH, al ser fragmentadas por proteólisis adquieren propiedades vasoinhibitorias, en el caso de la PRL las enzimas que realizan el corte son: MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 y MMP-13), proteína morfogénica de hueso (BMP-1), y catepsina D. En GH las enzimas que participan en este procesamiento son: BMP-1, trombina, plasmina, subtilisina y crimotripsina (Clapp et al., 2009).

En cuanto a la PRL se ha observado que en particular la catepsina-D es la que realiza el corte en la AP, particularmente en las vesículas secretoras ya que requiere de un pH bajo para su funcionamiento (Clapp et al., 2009).

La acción directa de las kisspeptinas sobre la hipófisis también se ha estimado y demostrado en algunos casos. Estudios *in vivo* con PCR de tiempo real e inmuno histoquímica muestran que la expresión tanto de KiSS-1 como de KISS1R está

regulada diferencialmente por esteroides siguiendo un patrón similar al observado en el AVPV (Richard et al., 2009).

2. ANTECEDENTES

Se ha reportado que Kisspeptina-10 (Kp-10) puede estimular la secreción de LH en explantes de AP de ratas macho de manera dosis-dependiente, sin embargo el efecto es cuatro veces menor que el producido por GnRH (Navarro et al., 2005). Efectos similares se han encontrado utilizando células de hipófisis dispersas, de ratas machos y hembras peripuberales. En este caso se observó que Kp-10 a una concentración de 10nM estimuló un aumento en los niveles de $[Ca^{++}]$ intracelular en gonadotropos y somatotropos con la subsiguiente liberación de LH y GH. Al analizar la respuesta en muestras de ratas macho, se observaron efectos aditivos en la liberación de LH al ser administrada junto con GnRH en gonadotropos. En cuanto a la respuesta de los somatotropos al tratamiento con Kp-10 (10nM), la liberación de GH fue de menor magnitud, y no se observan efectos aditivos (Gutiérrez-Pascual et al., 2007).

También se ha observado la estimulación de liberación de LH en células de hipófisis dispersas en el cerdo y vaca, pero han sido muy pobres (Suzuki et al., 2008).

En un estudio más reciente se analizó el efecto directo de Kp-10 a concentraciones de 10, 100, 1000 y 10,000 nM sobre la secreción de GH y PRL en cultivos primarios de AP de bovino al mes y a los 8 meses de edad, encontrando que para GH la secreción aumenta a partir de la dosis de 100 nM en AP de becerros de 1 mes y a partir de 1000 nM en cultivos de becerros de 8 meses. Siendo mayor el incremento en la secreción de GH en cultivos de un mes. En cuanto a la PRL se observó que en cultivos de AP de becerros de un mes, ninguna de las dosis de Kp-10 probadas tuvo efecto sobre la secreción de PRL y en los cultivos de AP de becerros de 8 meses solo las dosis de 1000 y 10,000 nM aumentaron la secreción de PRL (Kadokawa et al., 2008). Así, estos resultados resaltan la importancia del estado fisiológico y el contexto específico necesario, para que un tipo celular sea capaz de reaccionar a un estímulo.

Recientemente, Szawka y colaboradores (2010) demostraron que las kisspeptinas regulan la liberación de PRL a través de la inhibición de las neuronas

dopaminérgicas hipotalámicas, y que éste mecanismo es dependiente de E2 en ratas hembra. Observaron también que la secreción de PRL incrementa por la administración icv de Kp-10 (0.3- a 3 nM) en ratas macho y hembra, y reportan que no encontraron efectos de Kp-10 en cultivos primarios de AP a estas dosis. Por otro lado, a la fecha no existen reportes de los posibles efectos de Kp-10 en líneas celulares hipofisiarias, a pesar de que se ha demostrado la expresión tanto del receptor como de las kisspeptinas en varios tipos celulares de la AP (Richard et al., 2009).

3. Justificación

Hasta el momento la mayoría de los estudios sobre los efectos de las kisspeptinas se han enfocado en su acción sobre el eje reproductivo o sobre su participación en la metástasis en distintos tipos de cáncer. Esto a pesar de que tanto el receptor KISS1R como la proteína, se han encontrado en poblaciones celulares de la hipófisis donde se desconoce la acción directa de Kp-10. Los escasos estudios dedicados a medir sus efectos en secreción y expresión hormonal en AP han sido dirigidos a hormonas gonadotrópicas y GH utilizando cultivos primarios de rata (Gutiérrez-Pascual et al., 2007; Richard et al., 2009). También se han hecho estudios para medir secreción de PRL y GH en cultivos primarios de AP de terneros (Kadokawa et al., 2008) y se encontraron efectos solo a dosis farmacológicas de Kp-10.

El papel de Kp-10 sobre líneas de cultivos celulares como GH3 y GH4C1, no ha sido analizado a fondo y dado que son líneas clonadas de adenomas, podrían arrojar información valiosa sobre la participación del sistema kisspeptinérgico sobre la actividad de líneas celulares tumorales. Además sabemos que los adenomas con mayor incidencia clínica son los prolactinomas y difícilmente llevan a cabo metástasis lo cual resulta contradictorio al tomar en cuenta que la PRL y GH, son proangiogénicas lo cual debiera inducir la metástasis. Basados en esta información y conociendo que las formas fragmentadas de estas hormonas tienen funciones vasoinhedoras, que pueden afectar el desarrollo tumoral, pensamos que sería importante determinar que isoforma (tamaño en KDa) de la PRL y GH es producida por estos líneas celulares y si su expresión y secreción se ve influenciada de algún modo por las kisspeptinas.

4. Hipótesis

Las kisspeptinas afectan la función secretora de los somatolactotropos así como la expresión de los genes de PRL y GH.

5. Objetivo General

Estudiar la participación del sistema kisspeptinas/KISS1R en la función de los somatolactotropos adenohipofisarios de las líneas celulares GH3 y GH4C1.

5.1 Objetivos Particulares

- Determinar el efecto de kisspeptinas sobre la expresión del gen de PRL y GH en somatolactotropos inmortalizados GH3 y GH4C1.
- Evaluar si la administración de Kp-10 modifica los niveles de producción y secreción de PRL y GH en somatolactotropos inmortalizados GH3 y GH4C1.

6. Método

6.1 Modelo experimental

Se han desarrollado líneas celulares clonares a partir de células secretoras de GH provenientes de tumores de hipófisis, inicialmente inducidos por rayos X en ratas hembra Wistar-Furth, tal es el caso de las líneas celulares GH3 y GH4C1, desarrolladas por Tashjian Jr. en el año 1965 y 1972 respectivamente. Estas líneas celulares tienen una morfología tipo epitelial y son capaces de formar tumores cuando son inyectadas en ratas sanas. También secretan PRL, por lo cual se conocen como somatolactotropos o somatomamotropos, expresan receptores a TRH, hormonas tiroideas y somatostatina (Tashjian,1979) sin embargo carecen de receptores a dopamina funcionales (D2) y liberan la prolactina rápidamente, no forman gránulos de almacenamiento, por lo que no se da una degradación intracelular de la misma, como en los lactotropos normales. Las células GH4C1 son clonas derivadas de células GH3 que producían poca o niveles no detectables de GH, por lo que en comparación con las GH3, las células GH4C1 producen niveles bajos de GH y más altos de PRL (Ooi et al., 2004). En este estudio se analiza la respuesta secretora de estos somatolactotropos a Kp-10 que es una proteína cuyo papel como secretagogo a nivel hipotalámico fue descubierto recientemente y cuya función a nivel de AP no ha sido analizado a fondo.

6.2 Cultivo de células GH3 y GH4C1

Se cultivaron por separado células GH3 y GH4C1 en cajas petri de 35 mm de diámetro, con medio F-12 de HAM para GH3 y con F-10 para GH4C1, que son los medios basales desarrollados por la ATCC (American Type Culture Collection). Los medios fueron adicionados con suero fetal bovino (2.5%) y suero de caballo (15%), como se recomienda para permitir la propagación celular. Estos cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ en aire

saturado de agua, el medio se cambió cada tercer día y se subcultivaron cuando la confluencia alcanzó un 80 o 90% de la capacidad del recipiente. La disociación de las células para cambio de recipiente se llevó a cabo con tripsina (Hyclone, Invitrogen). Las células se centrifugan a 1000 rpm por 5 minutos, para después recuperarlas y sembrarlas en una nueva caja.

6.3 Diseño experimental

En dos placas de 12 pozos se sembraron aproximadamente 50,000 células, ya fueran GH3 o GH4C1 con su medio correspondiente: F-12 o F-10, donde se incubaron por 24 horas, posterior a esta incubación el medio fue cambiado por medio definido (Opti-MEM, Gibco-BRL) sin suero. Optimem es un medio diseñado para reducir los requerimientos de suero y se ha probado su efectividad para mantener y permitir el crecimiento en líneas celulares tanto adherentes como no adherentes.

En cada placa se pusieron por triplicado los tratamientos de Kp-10 a concentraciones de 0, 1, 10 y 100 nM. Los medios fueron colectados a la hora y a las 24 horas para medir la secreción de PRL y GH a estos tiempos. Después de la colección final de medios, las células de una placa fueron utilizadas para la extracción de ARN y las de la segunda se trataron con solución de lisis para cuantificar las concentraciones intracelulares de PRL y GH.

6.4 Extracción, purificación y cuantificación de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo al método de Chomczynski y Sacchi. El TRIzol es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que se emplea para aislar ARN en un solo paso.

Brevemente: después de la última incubación de las células, se extrajo el medio y las células fueron lavadas con una solución de fosfatos (PBS), después de extraer el PBS, se agregó 1 ml de TRIzol en cada pozo, dejándolo reposar por 5 minutos

para recolectarlo raspando el plato y haciendo pasar la solución por la punta de la pipeta en repetidas ocasiones, este homogeneizado celular es colocado en un tubo eppendorf de 2 ml donde se agregan 200 μ l de cloroformo, el cual se agita vigorosamente por 15 segundos y se incuba a 25°C por 5 minutos para ser centrifugado por 15 min a 12,000 rpm para permitir que la fase acuosa que contiene el ARN se separe, poder recuperarla y colocarla en un tubo nuevo donde se agregan 500 μ l de alcohol isopropílico para la precipitación del ARN, después de incubarlo y centrifugarlo se vacía el contenido del tubo y se agregan 200 μ l de etanol al 75% para lavar el material adherido al tubo, el etanol es retirado y se deja secar el tubo por unos minutos, por último se agregan 15 μ l de agua DEPC (desionizada y libre de RNAsas) y se incuban las muestras por 15 minutos a 55°C antes de almacenarlas a -20°C. Después de la extracción las muestras fueron tratadas con deoxirribonucleasa I (DNA-free, Ambio, Austin, Tex., USA).

El contenido de RNA de las muestras fue cuantificado por medio de un espectrofotometro (nanodrop), de este modo pudimos conocer su pureza y cantidad en ng/ μ l.

6.5 PCR de retrotranscripción

El ADNc fue sintetizado usando entre 1 y 2 μ g de ARN como templado en una reacción que contenía 1 μ l de oligo-dT, y 200 unidades de transcriptasa reversa (Promega Biotech) por tubo.

Para esta reacción de retrotranscripción las muestras de ARN diluidas con agua libre de RNAsas se colocan en el termociclador con los oligos a 65°C por tres minutos, y así permitir la extensión completa del ARN. Posteriormente las muestras son colocadas en hielo y se adiciona el resto de los reactivos: buffer (5X) 4 μ l, DTTs (100 μ M) 2 μ l, dNTPs (20 μ M) 1 μ l, transcriptasa reversa 1 μ l, e inhibidor de RNAsa 0.5 μ l. En este caso se mantuvo por 2 horas a 42°C para la amplificación y 20 minutos a 65°C para desactivar la enzima. Después de su obtención las muestras de ADNc son almacenadas a -80°C.

6.6 PCR

A partir del ADNc obtenido por retrotranscripción de ARN de células GH3 y GH4C1, se realizaron amplificaciones por medio de PCR para actina, con la finalidad de verificar la funcionalidad del ADNc.

También se hicieron PCRs para el gen de PRL, GH y del receptor de KISS1R.

El PCR para PRL se llevó a cabo en una reacción con un volumen final de 20µl, donde se emplearon 0.2 µl de dNTPs (20 µM), 0.2 µl de cada oligo (25 µM) y 0.1 µl de Taq Polimerasa (Invitrogen) por tubo, con un 1 µg de ADNc.

En la Tabla 1 se muestran los oligonucleótidos empleados para las PCRs de PRL (250pb).

Tabla 1. Oligonucleótidos para PCR convencional de PRL (250 pb).

Oligo	Secuencia	ID del Gen (Pubmed)
Exon5	GTTTGGTCACAACCTCCCATC	24683 Prl
Exon4	CCTGGAATGACCCTCTGTTT	24683 Prl

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: el primer paso de desnaturalización a 80°C por 1 min., seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, finalmente la extensión se llevo a cabo por 7 minutos a 72°C. Después de la amplificación las muestras fueron conservadas a -80°C.

Para el gen de GH fueron empleadas las mismas concentraciones de los reactivos donde la única diferencia son los primers específicos (Tabla 2.).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 80°C por 1 min., seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, finalmente la extensión se llevo a cabo por 7 minutos a 72°C. Después de la amplificación las muestras fueron conservadas a -80°C.

Tabla 2. Oligonucleótidos para PCR convencional de GH (205pb).

Oligo	Secuencia
3'rGH	AATGTAGGCACGCTCGAACT
5'rGH	GACAGATCACTGAGTGGCGA

En el caso del receptor KISS1R se llevó a cabo un PCR de gradiente (Touchdown PCR) para determinar la temperatura de alineación óptima, en éste se probaron temperaturas desde los 55°C a los 65°C. Encontrando que a de 60°C se obtenía una banda mejor definida. La concentración de los reactivos fue la misma que en las PCRs antes mencionadas, pero en este caso se utilizaron 2 µg de RNA para la retrotranscripción, es decir el ADNc para estas reacciones se obtuvo a partir del doble de RNA que se empleo para los PCR de actina, PRL y GH.

Las condiciones para el PCR se mencionan a continuación: desnaturalización a 94°C por 4 min., seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, finalmente la extensión se llevo a cabo por 7 minutos a 72°C. Después de la amplificación las muestras fueron conservadas a -80°C. Los oligos para el receptor se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos para PCR convencional de KISS1R (101 pb).

Oligo	Secuencia
rGPR 54 A1	ACATGCAGACCGTCACCAAT
rGPR 54 S1	TCCACACTCATGGCTGTCAA

Posteriormente los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 1.2%.

6.7 PCR de tiempo real

En la PCR a tiempo real la acumulación del producto amplificado puede ser detectada y cuantificada conforme la reacción progresa, esto es, en tiempo real. Se incluye en la reacción un flouorforo que emite una señal proporcional conforme aumenta la cantidad de ADN sintetizado (Bernard y Wittwer, 2002). Por este método se pueden detectar los productos amplificados en la fase exponencial,

que es donde se da el primer aumento significativo en la cantidad del producto de PCR en respuesta a la cantidad inicial del templado usado en la reacción.

La alternativa más simple y barata es una sonda de unión a ADN de doble cadena, que cuantifica la producción del amplicón por el uso de agentes fluorescentes que se intercalan de manera no específica, como SYBR-green o bromuro de etidio. En este caso se utilizó SYBR-green. El ciclo umbral o C_T (threshold cycle) es el ciclo en el cual se da un aumento exponencial, reflejando la eficiencia de la reacción y es el punto más importante para la cuantificación, mientras más alta sea la cantidad de ADN en la muestra analizada, más rápido se llegará a este ciclo umbral C_T teniendo este un menor valor en consecuencia (necesita menos ciclos para llegar a este punto) (Pfaffl, 2001).

Los datos de la PCR en tiempo real pueden ser cuantitativos (números de copias de ADN) o cualitativos (presencia/ausencia de amplificación, o diferencias en la expresión). Para comparaciones de expresión relativa de genes es necesario utilizar un control endógeno, esto es un gen cuya expresión no varíe. En este caso se empleó el gen β -actina como referencia endógena. La cuantificación relativa con un gen endógeno de referencia es en sí un método de comparación de C_T .

En este método no es necesario incluir una curva estándar con cantidades conocidas del gen, como se hace para la cuantificación absoluta, basta con que las dinámicas de reacción tanto del gen normalizador (constitutivo o endógeno) y el gen blanco, sean similares. Este método comparativo de C_T es el más práctico y se conoce como el método $\Delta\Delta C_T$ desarrollado por Livak. El cálculo inicia con la diferencia entre la variación de C_T (ΔC_T) entre los valores de C_T del gen blanco y el normalizador:

$$\Delta C_T = C_T (\text{blanco}) - C_T (\text{normalizador})$$

Este valor es calculado para cada muestra, el cálculo comparativo de $\Delta\Delta C_T$ involucra el encontrar la diferencia entre el valor de ΔC_T de cada muestra contra el ΔC_T de base. Una vez obtenidos estos valores es necesario convertirlos a valores absolutos mediante la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Para este estudio, se realizó una PCR de tiempo real relativo para PRL y GH usando como gen de referencia el gen de actina. Esto con las muestras de ADNc tanto de células GH3 como GH4C1.

6.8 Medio condicionado y lisado celular

Los medios condicionados fueron directamente extraídos de los pozos, se les colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml para centrifugarlos a 3,000 rpm (0.8 rcf) por 3 minutos, esto para eliminar restos no protéicos, posteriormente se extrajo el sobrenadante y se guardó en un tubo a -80°C.

Al analizar las muestras, encontramos que en los medios colectados a la hora la concentración de PRL y GH era muy baja, por lo cual los medios fueron concentrados por medio de centrifugación en columnas Centricon con un tamaño de poro de 10 KDa. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas por 50 minutos a 2,800 rpm.

En cuanto a las concentraciones de PRL y GH no secretada, las proteínas se extrajeron de los lisados celulares utilizando como buffer de lisis Nonidet P-40 al 0.5%, 0.1% SDS, 50 mM Tris, NaCl 150mM, 1 µg/ml de aprotinina y PMSF 0.5 mM.

Las células fueron primero lavadas con PBS y se les adicionó el buffer de lisis, dejándolo actuar por 5 minutos para después recuperarlo y homogeneizar la solución al pasar por la punta de la pipeta algunas veces, una vez hecho esto, el homogeneizado se guardó a -80°C.

6.9 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para la cuantificación de proteínas en lisados y medios condicionados se empleó el método de Bradford. Para la calibración de las lecturas se hizo una curva estándar de suero fetal bovino (BSA) de 0 a 5 µg de proteína, encontrándose todas las lecturas dentro de este rango. La lectura se realizó con un espectrofotómetro de la marca BIO-RAD, utilizando un filtro de 595 nm de

absorbancia, esto en placas de 96 pozos donde además de incluir la curva de BSA se colocaron 2 μ l de cada muestra, todo por duplicado, a partir del promedio de las absorbancias se hizo una regresión lineal para calcular la concentración de proteína total en microgramos por microlitro.

6.10 *Western blot*

Las muestras tanto de lisados como de medios condicionados fueron analizadas en geles de acrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). La proteína total cargada de acuerdo a la cuantificación de Bradford fue constante en cada gel y varió entre geles de 2 a 4 μ g.

Para el procedimiento de electroforesis, los geles fueron colocados en una cámara vertical donde se les aplicó una corriente de 110 volts por 2 horas y media, para permitir una separación adecuada de las proteínas.

Los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Para realizar la detección de PRL se utilizó como anticuerpo primario α -PRL de rata (C2), con una dilución de 1:500, incubado por 16 horas y el anticuerpo secundario utilizado fue α -conejo acoplado a fosfatasa alcalina a (1:5000), incubado por una hora. Para GH, se utilizó un anticuerpo primario anti-GH de rata (1:500) incubado por 16 horas y el anticuerpo secundario utilizado fue también α -conejo acoplado a fosfatasa alcalina a (1:5000), incubado por una hora.

Para las muestras de lisados la membrana fue recortada, la parte superior fue incubada con anti-tubulina (1:500) por 16 horas y como segundo anticuerpo se empleó α -conejo acoplado a fosfatasa alcalina. Esto sirve como control de carga, ya que la tubulina es una proteína constitutiva cuya expresión no debe verse afectada por los tratamientos.

Una vez obtenidos los Western blots, las membranas fueron escaneadas y las imágenes de estas analizadas con el programa Quantity One 4.6.9 de BIO-RAD, el cual analiza las bandas asignándoles un valor de densitometría de acuerdo a la intensidad de las mismas.

7. Resultados

7.1 Presencia del receptor *KISS1R*

Se evaluó la presencia del gen del receptor a Kp-10: *KISS1R* con ADNc de GH3 y GH4C1, donde fue necesario emplear el doble de RNA (2 μ g) para el PCR de retrotranscripción; ya que con el ADNc obtenido con un PCR de retrotranscripción con un microgramo de RNA, no logramos su amplificación. También se necesitaron diez ciclos más (40 ciclos) en el PCR de *KISS1R* para poder ver su expresión a través del gel de agarosa. En la Fig. 1 se observa la fotografía del gel donde se corrieron muestras de amplificaciones de *KISS1R* a partir de RNA extraído de células GH3 y GH4C1, usando ADN de hipotálamo como control positivo.

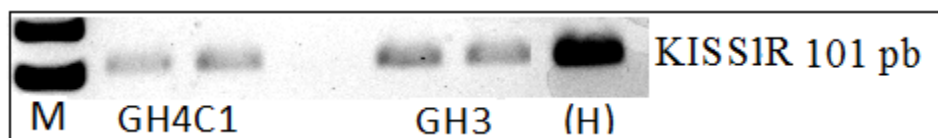


Fig. 1 PCR de *KISS1R* con ADNc de células GH3 y GH4C1, como control positivo ADN de hipotálamo (H). M: marcador de peso molecular.

7.2 Efecto de Kisspeptinas sobre la expresión de ARNm de PRL y GH

A partir del ADNc de células GH3 y GH4C1 se realizaron PCRs para PRL y GH donde no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos. Para ejemplificarlo en la figura 2. se muestra la fotografía de un gel de agarosa donde se corrieron los productos de un PCR para PRL de las muestras con los tres tratamientos de Kp-10: 1, 10, 100nM y el control, donde se trabajo con ADNc de células GH3, las pruebas se realizaron por triplicado.



Fig. 2, PCR para PRL con ADNc de células GH3. Concentraciones de Kp-10: 0, 1, 10 y 100 nM .

En el siguiente apartado se muestran los resultados obtenidos a través del PCR de tiempo real, para PRL y GH con ambos tipos celulares, esta técnica es más sensible a la variación en la expresión de genes.

7.3 PCR Tiempo real

Se realizó una cuantificación relativa de la expresión del gen para PRL (a partir del ADNc obtenido por retrotranscripción del ARN extraído de las células GH3 cultivadas). Esto por medio de una PCR de tiempo real, en la cual se estimó la expresión de este gen con base en el cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$. A partir de los valores de CT de actina y PRL se realizó la siguiente gráfica (Figura 3), donde se observa la expresión relativa de PRL. Los datos de expresión relativa fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA de una vía), donde no se encontraron diferencias significativas.

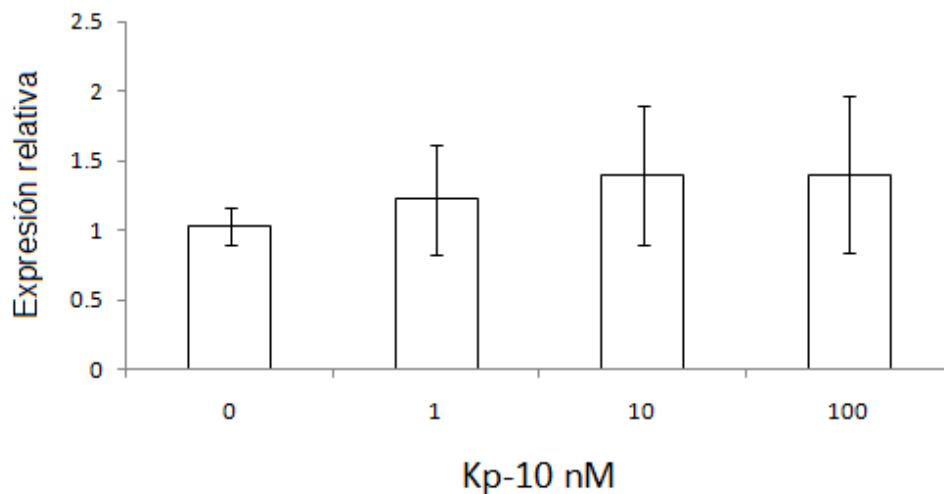


Figura 3. Cuantificación relativa de la expresión de PRL por medio de PCR Tiempo real en células GH3 (n=3).

También se estimó la expresión de GH en células GH3 por medio de PCR de tiempo real. A partir de los valores de CT de actina y GH se realizó la siguiente gráfica (Figura 4).

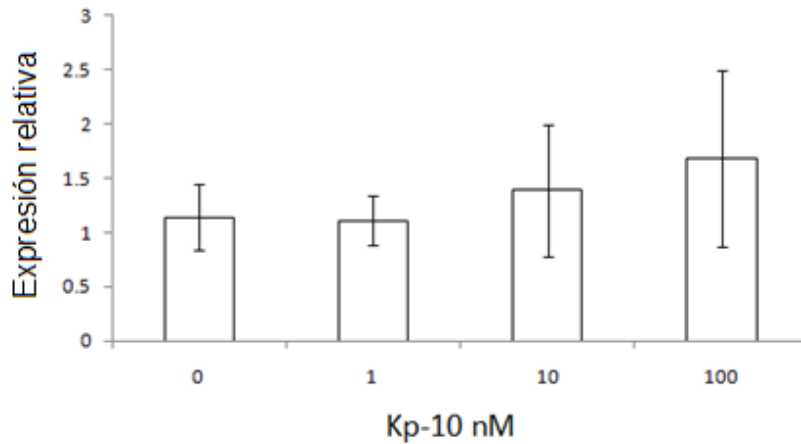


Figura 4. Cuantificación relativa de la expresión de GH por medio de PCR Tiempo real en células GH3 (n=3).

Como se puede observar en ambas gráficas (3 y 4) las diferencias en la expresión de ambos genes en células GH3 no se modificó de manera significativa por los tratamientos con Kp-10. Lo cual fue confirmado en ambos casos por medio de una ANOVA de una vía.

Del mismo modo se realizaron las cuantificaciones relativas de expresión de PRL (Fig. 5) y GH (Fig. 6) en células GH4C1 a partir de los valores de CT de actina y los de PRL y GH respectivamente.

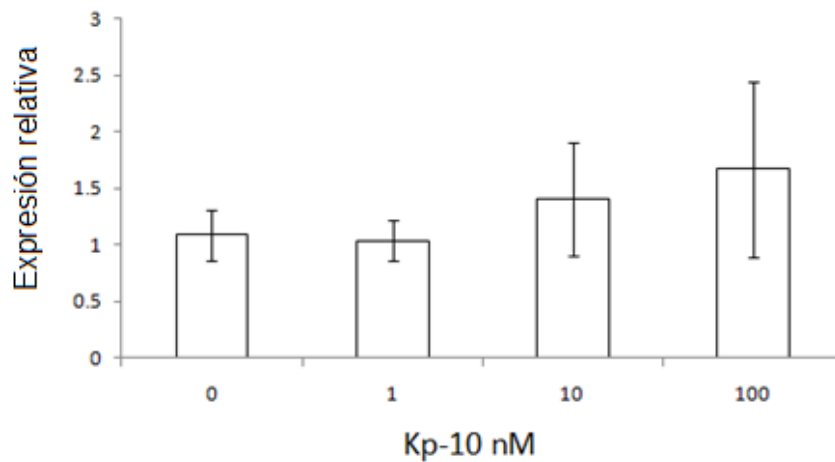


Figura 5. Cuantificación relativa de la expresión de PRL por medio de PCR Tiempo real en células GH4C1 (n=3).

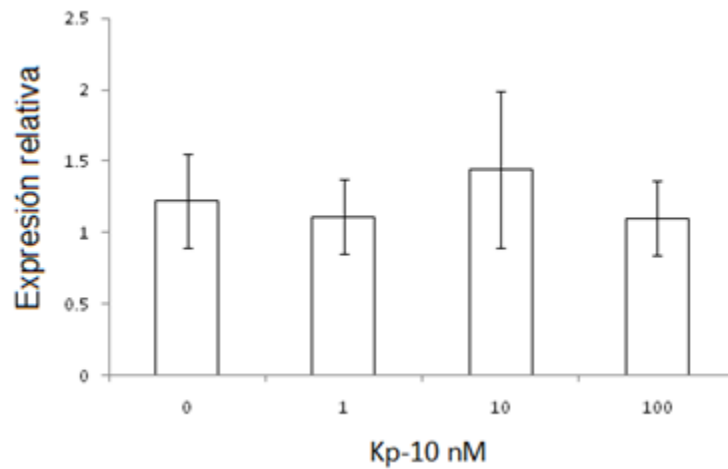


Figura 6. Cuantificación relativa de la expresión de GH por medio de PCR Tiempo real en células GH4C1 (n=3).

En cuanto a la expresión de GH y PRL en células GH4C1, la expresión tampoco se modificó en respuesta a los tratamientos con Kp-10, como se puede observar en las gráficas de las figuras 5 y 6.

En todos los casos se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía para probar si las diferencias en la expresión eran significativas y podían relacionarse con el tratamiento al que habían sido expuestas las células. En ningún caso los datos arrojaron diferencias significativas.

7.4 Efecto de Kisspeptinas sobre la secreción y producción de PRL y GH en células GH3 y GH4C1.

Como se describe en el método, los medios de cultivos celulares fueron extraídos a 1 hora y a las 24 horas después del tratamiento con Kp-10 (0,1,10,100 nM), más tarde se concentraron los medios (en el caso de los colectados a la hora) y se cuantificó la cantidad de proteínas totales. Se llevó a cabo la electroforesis y los geles fueron transferidos a membranas para el procesamiento con los anticuerpos correspondientes, haciendo así los Western blots para cada juego de muestras.

Para ambos tipos celulares GH3 y GH4C1, las membranas se incubaron para medir la secreción tanto de PRL como de GH a los tiempos antes mencionados (1 y 24 horas).

Para analizar la producción de estas hormonas se trabajó con los lisados celulares, para estas muestras, las membranas obtenidas fueron recortadas para incubar la parte superior de las mismas con anticuerpo anti-tubulina como control de carga.

A continuación se muestran imágenes representativas de los western blots y las gráficas obtenidas a partir de la lectura de los mismos, donde se gráfica la densidad óptica de las bandas contra el tratamiento al que fueron expuestas las células.

Las mediciones de densidad óptica (DO), se realizaron con el programa Quantity one de BIO-RAD. Para las gráficas, los datos fueron normalizados con respecto a la secreción (o síntesis) basal de proteínas en las células control. Esto es, se obtuvo el porcentaje de la lectura de densidad óptica, con respecto al control, en este caso, las células no tratadas.

Se realizó un análisis estadístico (ANOVA de una vía), de los datos obtenidos a partir de las lecturas y de esta forma determinar si las diferencias en la cantidad de proteínas podían estar relacionadas con los tratamientos con Kp-10. Se tomó como valor de significancia una $p < 0.05$ y se llevó a cabo una prueba de Tukey en los casos donde las diferencias fueron significativas.

7.4.1 Estimación de proteínas en células **GH3**.

En las siguientes figuras se muestran las gráficas e imágenes de los Western blots realizados para medir la secreción de PRL y GH a partir de las muestras de los medios colectados a la hora y a las 24 horas. También se muestran las correspondientes a la producción de hormonas obtenidas a partir de las muestras de lisados celulares.

Secreción de **PRL 1 hora** después del tratamiento con Kp-10, células **GH3**:

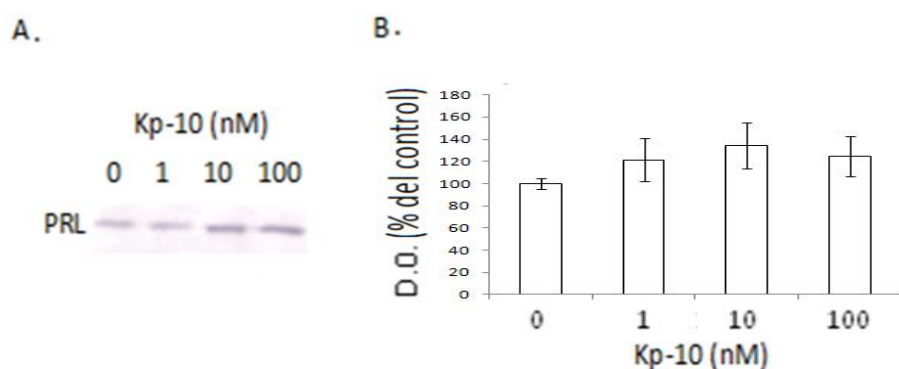


Fig 7. Secreción de PRL en células GH3 después de una 1 de tratamiento. **A.** Corte representativo de Western blot en SDS-PAGE (15%) para PRL. Fueron cargados 4 μ g de proteína totales por pozo de acuerdo a la cuantificación con Bradford. Las condiciones del tratamiento con Kp-10 se muestran en la parte superior 0, 1, 10 y 100nM. **B.** Gráfica obtenida a partir de la lectura del Western blot (n=3). No hay diferencias significativas.

Secreción de **PRL 24 hrs** después del tratamiento con Kp-10, células **GH3**:

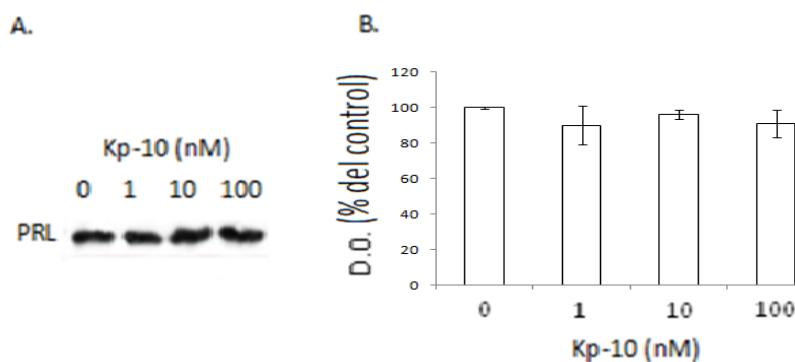


Fig 8. Secreción de PRL en células GH3 después de 24 horas de tratamiento. **A.** Corte representativo de Western blot en SDS-PAGE (15%) para PRL. Fueron cargados de 4 μ g de

proteína totales por pozo de acuerdo a la cuantificación con Bradford. Las condiciones del tratamiento con Kp-10 se muestran en la parte superior 0, 1, 10 y 100 nM. **B.** Gráfica obtenida a partir de la lectura del Western blot (n=3). No hay diferencias significativas.

Síntesis de PRL (lisados celulares), 24 horas después del tratamiento con Kp-10, células **GH3**.

Para el análisis de la producción de PRL en lisados de células GH3, se obtuvieron datos de tres experimentos independientes, en la figura 9 se muestra el Western blot y el análisis correspondiente de uno de ellos.

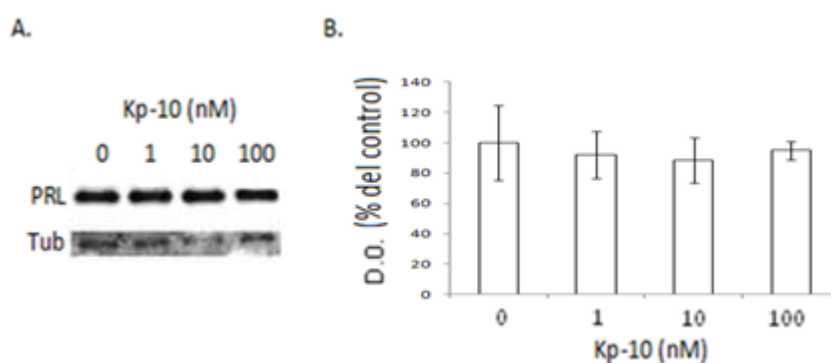


Fig 9. Producción de PRL en células GH3 lisadas después de 24 horas de tratamiento con Kp-10. **A.** Corte representativo de Western blot en SDS-PAGE (15%) para PRL. Fueron cargados de 4 μ g de proteína totales por pozo de acuerdo a la cuantificación con Bradford. Las condiciones del tratamiento con Kp-10 se muestran en la parte superior 0, 1, 10 y 100nM. **B.** Gráfica obtenida a partir de la lectura del Western blot (n=3). No hay diferencias significativas.

La gráfica de la Figura 10 corresponde a un promedio normalizado de las tres lecturas, de Western blots para PRL de lisados de células GH3. En ningún caso el análisis estadístico mostró diferencias significativas debidas al tratamiento.

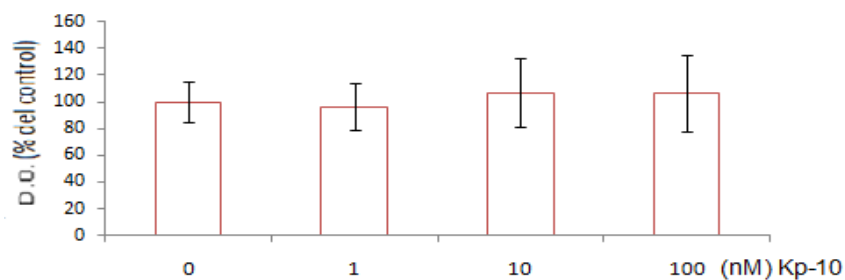


Fig 10. Producción de PRL en células GH3 lisadas después de 24 horas de tratamiento con Kp-10. Gráfica obtenida a partir de la lectura de tres Western blots de experimentos independientes (n=9).

En cuanto a la secreción de GH a la hora, las muestras fueron colectadas y concentradas en columnas, como se hizo en todos los casos de medios celulares colectados a la hora, sin embargo las lecturas de Bradford arrojaban valores muy bajos al momento de cuantificar las proteínas, por lo que se hizo un tratamiento con acetona para precipitar las proteínas. Aún después del tratamiento con acetona no se consiguió obtener una concentración de proteínas totales que nos permitiera visualizar las bandas de GH por medio del Western blot.

Secreción de **GH 24 horas** después del tratamiento con Kp-10, células **GH3**:

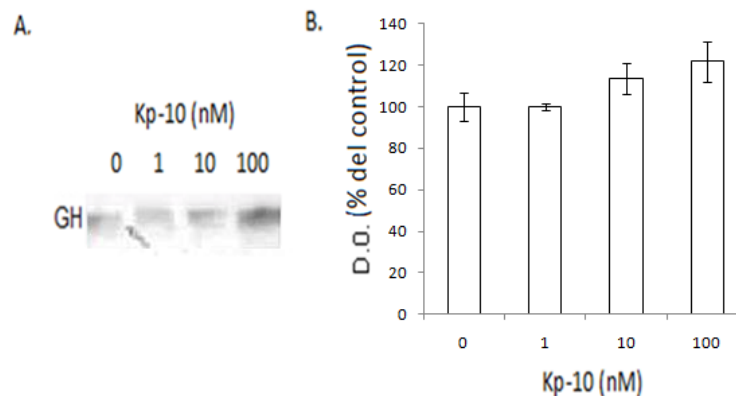


Fig 11. Secreción de GH en células GH3 después de 24 horas de tratamiento. **A.** Corte representativo de Western Blot en SDS-PAGE (15%) para GH. Fueron cargados de 3 μ g de proteína totales por pozo de acuerdo a la cuantificación con Bradford. Las condiciones del tratamiento con Kp-10 se muestran en la parte superior 0, 1, 10 y 100nM. **B.** Gráfica obtenida a partir de la lectura del Western blot (n=3). No hay diferencias significativas.

Síntesis de GH (lisados celulares), 24 horas después del tratamiento con Kp-10, células **GH3**:

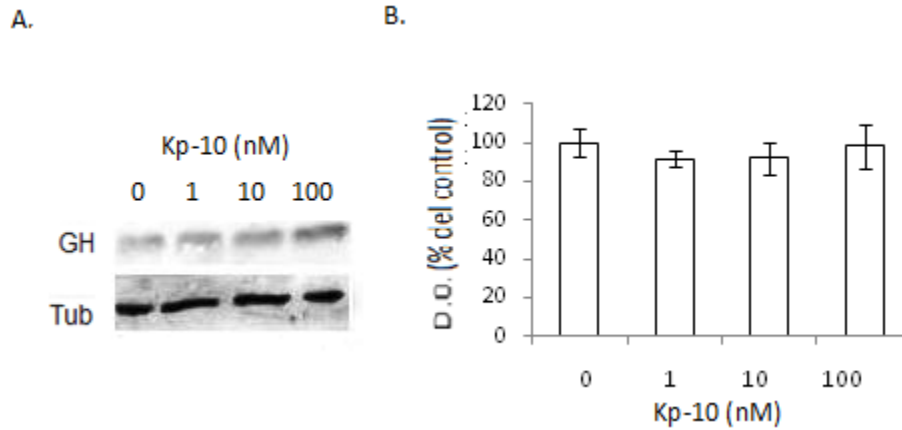


Fig 12. Producción de GH en células GH3 lisadas después de 24 horas de tratamiento con Kp-10. **A.** Corte representativo de Western blot en SDS-PAGE (15%) para GH. Fueron cargados de 3 μ g de proteína totales por pozo de acuerdo a la cuantificación con Bradford. Las condiciones del tratamiento con Kp-10 se muestran en la parte superior 0, 1, 10 y 100nM. **B.** Gráfica obtenida a partir de la lectura del Western blot (n=3).

7.4.2 Estimación de proteínas en células **GH4C1**.

Del mismo modo se obtuvieron las imágenes de los Western blots para la secreción y producción de GH y PRL en estas células, a continuación se muestran los fragmentos de los mismos y la gráfica obtenida a partir de su análisis.

Secreción de **PRL 1 hora** después del tratamiento con Kp-10, células **GH4C1**:

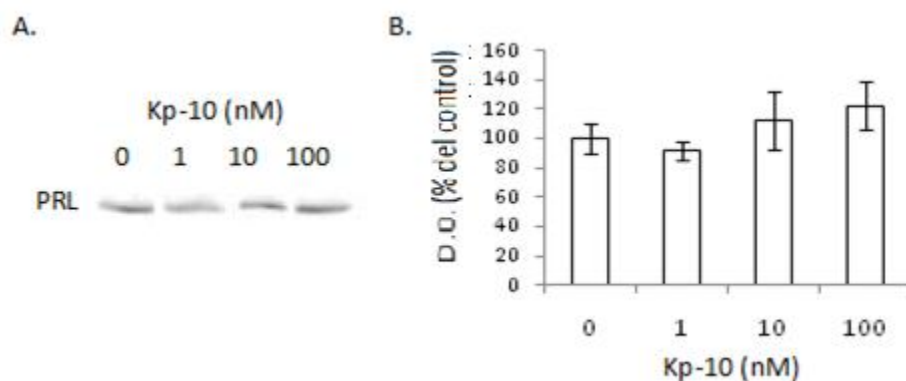


Fig 13. Secreción de PRL en células GH4C1 después de 1 hora de tratamiento. **A.** Corte representativo de Western blot en SDS-PAGE (15%) para PRL. Fueron cargados de 3 μ g de proteína totales por pozo de acuerdo a la cuantificación con Bradford. Las condiciones del tratamiento con Kp-10 se muestran en la parte superior 0, 1, 10 y 100nM. **B.** Gráfica obtenida a partir de la lectura del Western blot (n=3). No hay diferencias significativas.

Secreción de **PRL 24 horas** después del tratamiento con Kp-10, células **GH4C1**:

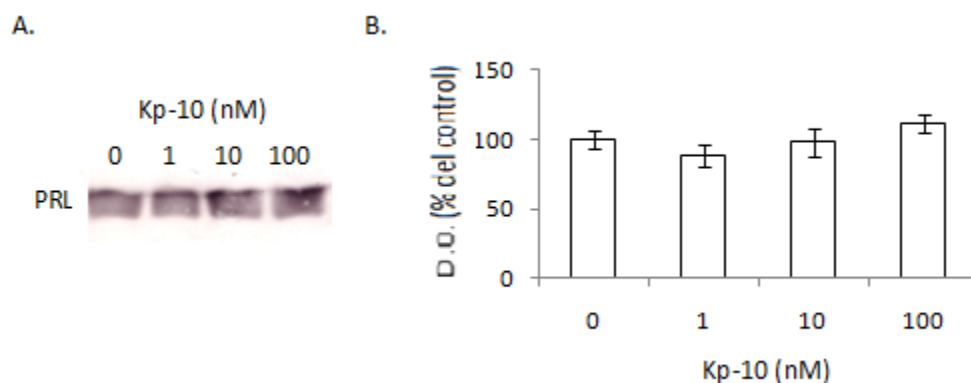


Fig 14. Secreción de PRL en células GH4C1 después de 24 horas de tratamiento. **A.** Corte representativo de Western blot en SDS-PAGE (15%) para PRL. Fueron cargados de 3 μ g de proteína totales por pozo de acuerdo a la cuantificación con Bradford. Las condiciones del

tratamiento con Kp-10 se muestran en la parte superior 0, 1, 10 y 100nM. **B.** Gráfica obtenida a partir de la lectura del Western blot (n=3). No hay diferencias significativas.

Síntesis de **PRL** (lisados celulares), 24 horas después del tratamiento con Kp-10, células **GH4C1**:

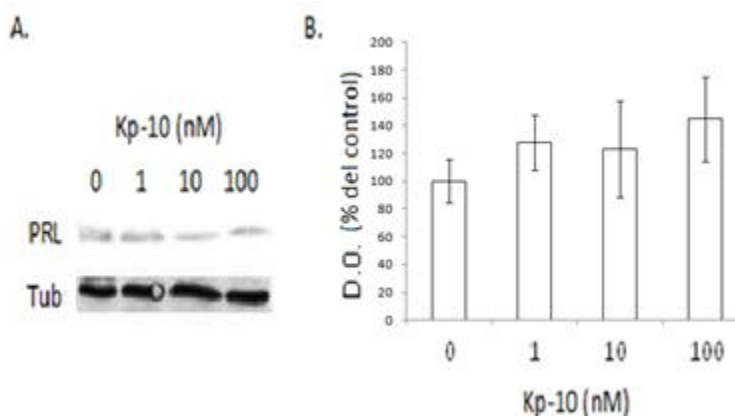


Fig 15. Producción de PRL en células GH4C1 lisadas después de 24 horas de tratamiento con Kp-10. **A.** Corte representativo de Western blot en SDS-PAGE (15%) para PRL. Fueron cargados 3 μ g de proteína totales por pozo de acuerdo a la cuantificación con Bradford. Las condiciones del tratamiento con Kp-10 se muestran en la parte superior 0, 1, 10 y 100nM. **B.** Gráfica obtenida a partir de la lectura del western blot (n=3). No hay diferencias significativas.

En cuanto a la secreción de GH a la hora no se pudo obtener una imagen de las bandas de GH que fuera susceptible de lectura, esto a pesar de que las muestras fueron concentradas con columnas y las proteínas precipitadas con acetona, las bandas obtenidas por medio del Western blot, resultaron ser tenues en ambos casos. Por lo cual solo se muestra la secreción de GH a las 24 horas.

Secreción de **GH 24 horas** después del tratamiento con Kp-10, células **GH4C1**:

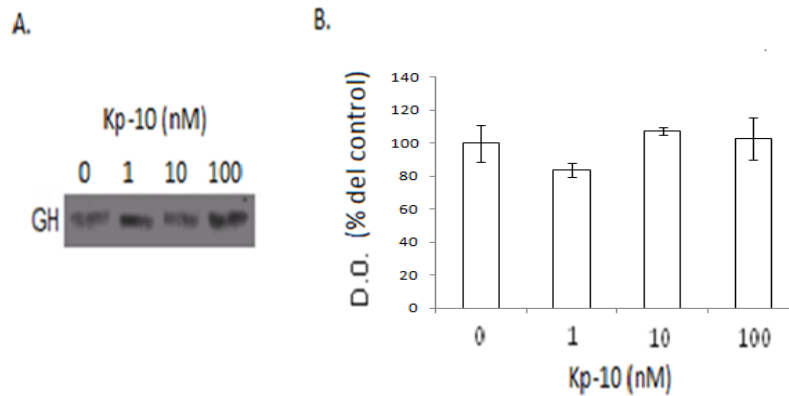


Fig 16. Secreción de GH en células GH4C1 después de 24 horas de tratamiento. **A.** Corte representativo de Western blot en SDS-PAGE (15%) para GH. Fueron cargados de 3 μ g de proteína totales por pozo de acuerdo a la cuantificación con Bradford. Las condiciones del tratamiento con Kp-10 se muestran en la parte superior 0, 1, 10 y 100nM. **B.** Gráfica obtenida a partir de la lectura del Western blot (n=3). No hay diferencias significativas.

Síntesis de **GH** (lisados celulares), 24 horas después del tratamiento con Kp-10, células GH4C1:

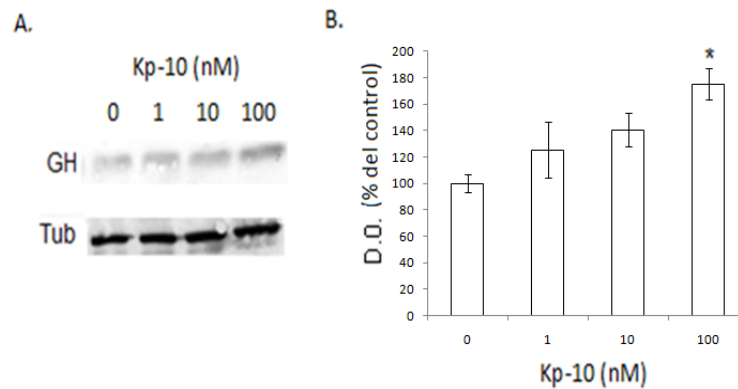


Fig 17. Producción de GH en células GH4C1 lisadas después de 24 horas de tratamiento con Kp-10. **A.** Corte representativo de Western blot en SDS-PAGE (15%) para PRL. Fueron cargados de 2 μ g de proteína totales por pozo de acuerdo a la cuantificación con Bradford. Las condiciones del tratamiento con Kp-10 se muestran en la parte superior 0, 1, 10 y 100nM. **B.** Gráfica obtenida a partir de la lectura del Western blot (n=3). *p<0.05 con respecto a la condición control (0 nM).

Este fue el único caso donde se encontraron diferencias significativas en cuanto a la secreción de hormonas relacionado al tratamiento con Kp-10. Observando que a una concentración de 100 nM aumento la secreción de GH significativamente.

8. Discusión

Receptor a kisspeptinas:

Nuestros resultados demuestran que el receptor KISS1R se expresa en las líneas celulares GH3 y GH4C1. Nuestra hipótesis plantea, que al estar presente en estas células derivadas de AP, pudieran tener efectos sobre la expresión de los genes de las hormonas que secretan o bien, en la producción y secreción de las mismas. Lo cual pudiera sustentar la participación del sistema kisspeptinérgico en la baja tasa de desarrollo de metástasis en tumores secretores de PRL y GH. Lo que planteamos es que dada la alta concentración de estas hormonas en este padecimiento, se pudieran estar fragmentando en sus formas antiangiogénicas (vasoinhibinas). Sin embargo la activación del receptor KISS1R desencadena un gran número de vías de señalización involucradas en otros procesos fisiológicos, dependiendo del tipo celular en el que se activen y el momento fisiológico en el que se encuentra la célula activada.

Gran parte de la información que se tiene al respecto se ha desarrollado en líneas celulares de cáncer, por ejemplo se ha visto que en células CHO (de ovario de hámster chino), al ser transfectadas con el receptor KISS1R, se inhibe la quimiotaxis de las mismas, así como la invasión. Su activación también cambia la morfología, inhibe la proliferación y migración de células COS-7 (Castaño et al., 2009). De igual modo, se ha reportado que la activación del receptor KISS1R regula a la baja la expresión de metaloproteasas de matriz como MMP-9, y se ha demostrado que promueve apoptosis en líneas celulares en proceso de metástasis (Murphy et al., 2005). Existen también reportes de que la activación de KISS1R inhibe la angiogénesis en tumores al suprimir la expresión de VEGF (factor de crecimiento endotelial) (Cho et al., 2009) actuando como agente vasoconstrictor en humanos (Mead et al., 2007).

En resumen, existe una amplia gama de efectos de la activación de KISS1R y el enfoque de este trabajo fue determinar si estos efectos incluían cambios en la producción, secreción y expresión de PRL y GH, en dos líneas celulares derivadas

de adenomas hipofisarios. Nuestros datos muestran que no hay efectos significativos más que en el caso de la producción de GH en células GH4C1, con la concentración más alta de Kp-10 (100 nM). Sin embargo no podemos descartar que la activación del receptor a kisspeptinas tenga algún otro efecto, como los mencionados con anterioridad, sobre los tipos celulares con los que se trabajó o en las células adenohipofisarias in situ, que también expresan el receptor. Además no podemos olvidar que las líneas celulares utilizadas en este proyecto, que son células inmortalizadas y por lo tanto desdiferenciadas, poseen características particulares que hacen distinta su fisiología. Dentro de sus cualidades distintivas están el carecer de receptores funcionales de dopamina (D2), siendo la dopamina el mayor inhibidor de la secreción de PRL, y que estas líneas celulares tampoco producen gránulos de almacenamiento de hormonas como se da en los lactotopos normales (Ooi et al., 2004), y es en esos mismos gránulos donde se da el corte proteolítico que convierte a esta hormona en su forma vasoinhibitoria, por lo tanto no podemos inferir que un cultivo primario de lactotopos o somatotopos, actuaría del mismo modo que nuestras células clonadas de adenomas hipofisarios (GH3 y GH4C1). Si bien es cierto que el trabajar con ellas se elimina el ruido proveniente de otros tipos celulares que están presentes en cultivos primarios por ejemplo, aún así, no podemos descartar que la respuesta fuera distinta dadas las diferencias en la fisiología de estas células.

Al enfocarnos en la producción y secreción hormonal, nuestro objetivo era explorar un efecto de las kisspeptinas sobre la función de estas células en lo referente a regulación hormonal, quizás los receptores estuvieran en la AP ejerciendo un papel como factor de liberación o inhibición de las mismas, esto sabiendo que los factores que intervienen son muy variados y cada uno tiene su importancia dentro de un contexto fisiológico en particular, al no encontrar pruebas claras o significativas de esto, solo resta plantear su intervención en otras vías que expliquen la existencia del receptor en la AP y en líneas celulares derivadas de ella, donde pueden estar participando ya sea en condiciones de normalidad o patológicas.

Expresión de ARNm

Para estimar si el tratamiento con Kp-10 induce algún efecto en la expresión de PRL o GH en las células GH3 y GH4C1, se extrajo el ARN y se hizo un PCR de retrotranscripción para obtener ADNc a partir de cultivos tratados con dosis de 0, 1, 10 y 100 nM de Kp-10. Posteriormente se realizó una PCR a partir del ADNc, este PCR convencional para PRL no es informativo dado que todas las muestras contienen suficiente ADNc como para llegar a un punto de saturación donde no fue posible distinguir diferencias en la expresión. El PCR para PRL se repitió disminuyendo el número de ciclos de amplificación sin embargo el resultado fue el mismo, por lo que fue necesario realizar una PCR de tiempo real, para hacer una cuantificación relativa de la expresión, tanto de GH como de PRL con ADNc de células GH3 y GH4C1, sin embargo como se mostró en las figuras 3 a 6, no se encontraron diferencias significativas, lo que indica la ausencia de efecto sobre la expresión de los genes de PRL y GH en respuesta a los tratamientos con Kp-10 en células GH3 y GH4C1.

Secreción y producción de proteínas

Los Western blots revelaron la presencia de una sola isoforma de PRL y GH, la más común en ambos casos, de 23 KDa y 22 KDa respectivamente. Lo cual descarta nuestra idea de la posible presencia de formas fragmentadas, vasoinhibinas, en este tipo de células derivadas de adenomas. El mecanismo por el cual se inhibe el desarrollo tumoral en estos casos, a pesar de los altos niveles de PRL y GH, no es la producción de formas vasoinhibitorias de PRL y GH, al menos no encontramos datos que respaldaran este supuesto.

La secreción de PRL y GH en células GH3 y GH4C1, a la hora y a las 24 horas de tratamiento con Kp-10 a diferentes concentraciones, no se modifica.

En cuanto a la producción de proteínas no secretadas, en el caso de la línea celular GH3, no se observaron diferencias en la respuesta al tratamiento de Kp-10 con ninguna de las concentraciones probadas.

En el caso de las células GH4C1 encontramos una tendencia al incremento en la producción de GH, llegando a ser significativa en el caso de la dosis de 100nM. Sin embargo sabemos que esta concentración es muy elevada en comparación con los niveles fisiológicos que pueden ser alcanzados, aún durante el pico de Kp-10 que se da durante la placentación donde aumenta 10,000 veces con respecto a la concentración basal.

De acuerdo a los reportes previos, Gutiérrez-Pascual y colaboradores (2007), reportaron que con cultivos primarios de AP de rata macho y hembra, la secreción de GH incrementa a una concentración de 10nM de Kp-10 y el efecto disminuye al administrar la concentración de 100 nM, aunque no existe ningún otro reporte de los efectos en la secreción de GH a estas dosis, al menos en cultivos de AP de rata. Solo tenemos como antecedente que apoye las observaciones de Gutiérrez-Pascual et al. (2007) el trabajo de Kadokawa et al. (2008), donde trabajan con cultivos primarios de AP de becerros en distintas etapas del desarrollo, al mes y a los 8 meses de edad, y prueban concentraciones de Kp-10 desde 10 a 10,000 nM, en él observan que, en cuanto a la secreción de GH, los cultivos de becerros más jóvenes respondieron al tratamiento con Kp-10, aumentando la secreción con concentraciones desde 100 nM, y en los de 8 meses solo respondieron al tratamiento de 1000 nM. En cuanto a la PRL, la Kp-10 solo tuvo efectos en los becerros de 8 meses, los de 1 mes no respondieron a ninguna concentración, en el caso de los becerros de 8 meses, las células responden al estímulo de Kp-10 aumentando la secreción de PRL, solo a partir de la dosis de 1000 nM.

Estos reportes señalan la importancia de la capacidad de las células de responder a los estímulos dado el contexto fisiológico en el que se encuentren, además si tomamos en cuenta que la concentración fisiológica de Kp-10 en plasma esta en el orden femtomolar, entre 1 y 2 fM, tenemos que la respuesta observada es farmacológica. Si bien es cierto que durante el primer semestre del embarazo las kisspeptinas aumentan hasta 10,000 veces su concentración (Waljit et al., 2006), esto nos hace volver al punto del contexto fisiológico en el que se encuentran las células.

Recientemente Szawka et al. (2010) analizaron el papel de Kp-10 sobre la secreción de PRL en el eje hipotálamo hipofisario, esto mediante la administración icv de Kp-10 (0.3, 1 y 3 nM), este grupo demuestra que Kp-10 inhibe las vías dopaminérgicas hipotalámicas en presencia de estrógenos, lo que a su vez estimula la secreción de PRL. Administraron también Kp-10 en cultivos primarios de AP de ratas, sin encontrar efecto alguno, aun con el tratamiento de estrógenos, lo que prueba que el efecto en la secreción de PRL por Kp-10, se da vía hipotalámica y sobre condiciones fisiológicas específicas.

La relevancia de este estudio radica en haber demostrado por medio de técnicas moleculares (PCR de tiempo real) y de biología celular (Western blot), que Kp-10 no afecta de manera significativa la secreción o producción de PRL y GH en dos líneas celulares derivadas de adenomas hipofisarios, GH3 y GH4C1. Aunque el receptor para KISS1R esté presente en estos tipos celulares, su función no está relacionada con la secreción hormonal, como esperábamos dada la evidencia en otros tipos celulares. Lo cual es importante para descartarlo de entre las funciones que pudiera estar teniendo en este u otros tipos celulares, dejando abierta la pregunta de su funcionalidad en otros procesos dentro de AP o líneas celulares derivadas de la misma.

9. Referencias

Adamson A, Friedrichsen S, Semprini S, Harper C, Mullins J, White M, and Davis J. 2008. Human prolactin gene promoter regulation by estrogen: Convergence with tumor necrosis factor- α signaling. *Endocrinology*. 149:687–694.

Becker JA, Mirjolet JF, Bernard J, Burgeon E, Simons MJ, Vassart G, Parmentier M y Libert F. 2005. Activation of GPR54 promotes cell cycle arrest and apoptosis of human tumor cells through a specific transcriptional program not shared by other Gq-coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326:677-686.

Bernard PS, Wittwer CT, 2002. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin. Chem.* 48:1178-1185.

Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S y Zoratti C. 2004. Kisspeptin- 10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J. Cell Sci.* 117:1319-1328.

Castaño PJ, Martínez-Fuentes AJ, Gutiérrez-Pascual E, Vaudry H, Tena-Sempere M, Malagón MM. 2009. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: Do multiple signals underlie function diversity? *Peptides* 30:10-15.

Cho S-G, Yi Z, Pang X, Yi T, Wang Y, Luo J, Wu Z, Li D y Liu M. 2009. Kisspeptin- 10, a KISS1-derived decapeptide, inhibits tumor angiogenesis by suppressing Sp1-mediated VEGF expression and FAK/Rho GTPase activation. *Cancer Res.* 69:7062-7070.

Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC y Martínez de la Escalera G. 2009. Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiol. Rev.* 89: 1177-1215.

Colledge WH. 2008. GPR54 and Kisspeptins. *Results Probl. Cell Differ.* 46:117-143.

d'Anglemont de Tassigny LA, Fagg JP, Dixon K, Day HG, Leitch AG, Hendrick D, Zahn I, Franceschini A, Caraty MB, Carlton SA y Colledge WH. 2007. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:10714–10719.

de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL y Milgrom E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10972-10976.

Devesa J, Lima L, y Tresguerres AF. 1992 Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends. Endocrinol. Metab.* 3:175-183.

Fitzgerald P y Dinan T. 2008. Prolactin and dopamine: What is the connection? A review article. *J. Psychopharmacol.* 22(2):12-19.

Freeman M, Kanycska B, Lerant A, and Nagy GR. 2000. Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80(4):1524-1585.

Garcia de la Torre N, Turner H, y Wass J. 2005. Angiogenesis in Prolactinomas: regulation and relationship with tumour behaviour. *Pituitary* 8: 17–23.

Gutierrez-Pascual E, Martinez-Fuentes AJ, Pinilla L, Tena-Sempere M, Malagon MM y Castano JP. 2007. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs, and stimulation of luteinizing hormone and growth hormone secretion. *J. Neuroendocrinol.* **19**: 521–530.

Jacobi JS, Martin C, Nava G, Jeziorski MC, Clapp C y Martínez de la Escalera G. 2007. 17-Beta-Estradiol Directly Regulates the Expression of adrenergic Receptors and Kisspeptin/GPR54 System in GT1-7 GnRH Neurons. *Neuroendocrinology* 86:260-269.

Kacsoh B. *Endocrine Physiology*. 2000. U.S.A. Ed. McGraw-Hill.

Kadokawa H, Suzuki S y Hashizume T. 2008. Kisspeptin-10 stimulates the secretion of growth hormone and prolactin directly from cultured bovine anterior pituitary cells. *Anim. Reprod. Sci.* 404-408.

Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E. 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* 276:34631-34636.

Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S y Polonski KS, *Williams Textbook of Endocrinology*. 3rd ed. Ed. Saunders. 2003. Pp.1927.

Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE y Davenport AP. 2007. Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 1-11.

Mendez I y Cariño CD. 2005. La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos. *Rev. Invest. Clín.* 57(3):447-456.

Messenger S. 2005. Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty. *J. Neuroendocrinol.* 17:687-688.

Müller E, Locatelli V y Cocchi D. 1999. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol. Rev.* 79:511-607.

Murphy KG. 2005. Kisspeptins: Regulators of metastasis and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J. Neuroendocrinol.* 17:519-525.

Navarro V, Castellano J, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vázquez M, Barreiro M, Magni P, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L y

Tena-Sempere M. 2005. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 146(1):156–163.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura H y Fujino M. 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 411: 613-617.

Ooi GT, Tawadros N y Escalona RM, 2004. Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol. Cell. Endocrinol.* 228:1-21.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.

Richard N, Corvaisier S, Camacho E y Kottler ML. 2009. Kiss-1 and GPR54 at the pituitary level: Overview and recent insights. *Peptides* 30:123-129.

Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS y Shagoury JK. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New Engl. J. Med.* 349:1614-1627.

Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK y Steiner RA, 2005a. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146:3686-3692.

Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK y Steiner RA. 2005b. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146:2976-2984.

Suzuki S, Kadokawa H, Hashizume T. 2008. Direct kisspeptine-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Anim. Reprod. Sci.* 103:360-365.

Szawka RE, Ribeiro AB, Leite CM, Cleyde VV, Franci CR, Anderson GM, Hoffman G, y Anselmo-Franci JA. 2010. Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. *Endocrinology.* 151:3247-3257.

Tashjian AH Jr. 1979. Clonal strains of hormone-producing pituitary cells. *Methods Enzymol.* 58: 527-535.

Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Harris AL y Wass JAH. 2000. Angiogenesis in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:1159-1162.

Van De Weerd C, Peers B, Belayew A, Martial JA y Muller M. 2000. Far upstream sequences regulate the human prolactin promoter transcription. *Neuroendocrinology* 71: 124-137.

Waltij SD, Savage P, Murphy KG, Chaudhri OB, Patterson M, Nijher G M, Foggo VM, Dancey GS, Mitchell H, Seckl MJ, Ghatei MA y Bloom SR. 2006. Plasma Kisspeptin is raised in patients with gestational trophoblastic neoplasia and falls during treatment. *Am. J. Physiol. endocrine Metab.* 291:878-884.

11. LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 PCR KISS1R con células GH3 y GH4C1	21
Fig. 2 PCR PRL de células GH3	21
Fig. 3 PCR de tiempo real para PRL en células GH3	22
Fig. 4 PCR de tiempo real para GH en células GH3	23
Fig. 5 PCR de tiempo real para PRL en células GH4C1	23
Fig. 6 PCR de tiempo real para GH en células GH4C1	24
Fig. 7 Secreción de PRL en células GH3 a la hora	26
Fig. 8 Secreción de PRL en células GH3 a las 24 horas	26
Fig. 9 Producción de PRL en células GH3 (1)	27
Fig. 10 Producción de PRL en células GH3 (n=9)	27
Fig. 11 Secreción de GH en células GH3 a las 24 horas.	28
Fig. 12 Producción GH en células GH3	29
Fig. 13 Secreción de PRL en células GH4C1 a la hora	30
Fig. 14 Secreción de PRL en células GH4C1 a las 24 horas	30
Fig. 15 Producción de PRL en células GH4C1	31
Fig. 16 Secreción de GH en células GH4C1 a las 24 horas	32
Fig. 17 Producción de GH en células GH4C1	32

11. ANEXOS

A. CTs obtenidos por medio de PCR de tiempo real

Cuadro 1. CTs PRL y Actina por duplicado, células GH3

TRATAMIENTO	CT PRL	CT PRL (2)	CT actina	CT actina (2)
CONTROL	23.73	24.31	14.42	14
CONTROL	22.67	23.75	12.67	12.71
CONTROL	24.91	26.27	15.53	14.7
Kiss1 nM	20.83	21.27	11.87	11.68
Kiss1 nM	22.38	22.8	15.05	15.09
Kiss1 nM	22.09	22.21	14.84	15.57
Kiss10 nM	21.72	21.21	11.81	12.32
Kiss10 nM	27.95	27	15.48	14.45
Kiss10 nM	22.22	23.87	14.13	11.32
Kiss 100 nM	25.66	25.23	13.94	14.48
Kiss 100 nM	27.87	28.2	18.61	18.5
Kiss 100 nM	28.98	29.19	20.04	21.85

Cuadro 2. CTs GH y Actina por duplicado, células GH3

TRATAMIENTO	CT GH	CT GH (2)	CT actina	CT actina2
CONTROL	26.75	25.34	16.95	15.82
CONTROL	24.65	25.64	16.69	18
CONTROL	26.24	24.89	17.08	16.81
Kiss1 nM	24.54	26.24	20.61	18.4
Kiss1 nM	25.86	25.61	19.05	20.65
Kiss1 nM	26.73	23.6	20.44	15.07
Kiss10 nM	26.7	26.91	19.52	20.62
Kiss10 nM	26	27.16	18.47	19.33
Kiss10 nM	25.51	26.4	23.12	19.07
Kiss 100 nM	27.12	25.49	17.05	18.14
Kiss 100 nM	26.98	24.23	19.57	18.18
Kiss 100 nM	26.32	25.72	21.41	20.9

Cuadro 3. CTs PRL y Actina por duplicado, células GH4C1

TRATAMIENTO	CT PRL	CT PRL(2)	CT actina	CT actina(2)
CONTROL	23.92	27.47	25.4	27.2
CONTROL	25.88	22.9	24.9	27.87
CONTROL	22.36	22.59	23.49	25.45
Kiss1 nM	27.23	29.32	24	32
Kiss1 nM	27.8	25.87	29.5	24.02
Kiss1 nM	28.51	26.08	27.9	28.02
Kiss10 nM	29.6	25.9	24	26.24
Kiss10 nM	27.7	23	23.34	20.49
Kiss10 nM	32.3	27.29	24.9	23.04
Kiss 100 nM	32	26.07	22.7	30.1
Kiss 100 nM	33	25.33	29.14	20.6
Kiss 100 nM	32	23.84	23.05	19.71

Cuadro 4. CTs GH y Actina por duplicado, células GH4C1

TRATAMIENTO	CT GH	CT GH (2)	CT actina	CT actina (2)
CONTROL	26.42	26.29	25.4	26.12
CONTROL	27.81	28.65	24.9	25.87
CONTROL	24.27	26.43	23.49	25.45
Kiss1 nM	27.23	30.34	23.9	28.32
Kiss1 nM	26.41	24.9	24.5	24.33
Kiss1 nM	29.36	27.52	27.9	26.82
Kiss10 nM	26.31	27.44	24.9	25.24
Kiss10 nM	28.71	27.29	23.34	22.49
Kiss10 nM	27.12	26.83	25.12	23.04
Kiss 100 nM	25.32	24.8	22.7	23.1
Kiss 100 nM	28.45	26.72	25.14	23.6
Kiss 100 nM	26.14	25.84	23.05	21.71

