



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

Caracterización del receptor y de los  
mecanismos de señalización implicados en  
el efecto no genómico del 17beta-estradiol  
en el islote de Langerhans de ratón

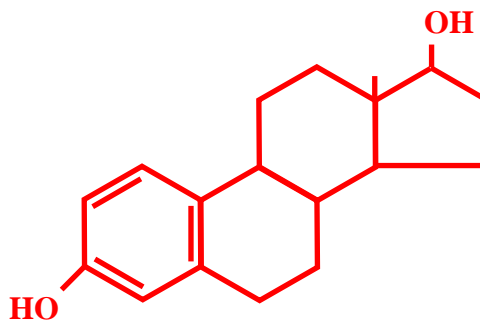
Memoria de Tesis Doctoral

Ana Belén Roperó Lara  
San Juan, Julio 2001

**INSTITUTO DE BIOINGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA  
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ**

Programa de Doctorado de Bioingeniería

“Caracterización del receptor y de los  
mecanismos de señalización implicados en el  
efecto no genómico del 17beta-estradiol en el  
islote de Langerhans de ratón”



Memoria presentada por **Ana Belén Ropero Lara**  
para optar al grado de **Doctor**

Directores:      Dr. Bernat Soria Escoms  
                         Dr. Ángel Nadal Navajas

Ana Belén Ropero Lara  
San Juan, Julio 2001

# ÍNDICE

---

<b>ÍNDICE</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>I.- ESTRÓGENOS</b>	5
I.A.- Función de los estrógenos	7
Efectos generales en la mujer	7
Ciclo menstrual	7
Gestación	8
I.B.- Receptores de estrógenos intracelulares clásicos	9
I.C.- Efectos rápidos de los estrógenos por vías alternativas	11
Efectos rápidos de los estrógenos	14
Vías de señalización intracelular activadas por estrógenos	15
Sistema nervioso	17
Sistema cardiovascular	18
I.D.- Receptor de estrógenos de membrana	19
El receptor clásico en la membrana plasmática	21
Receptor de membrana no clásico	22
<b>II.- EL ISLOTE DE LANGERHANS</b>	24
II.A.- La célula beta pancreática	25
Secreción de insulina inducida por glucosa	25
El canal de potasio dependiente de ATP ( $K_{ATP}$ )	27
El calcio intracelular en la célula beta	27
Vías de señalización intracelular activadas por glucosa	29
II.B.- La célula alfa pancreática	31
<b>III.- ESTRADIOL Y PÁNCREAS</b>	34
<b>OBJETIVOS</b>	36
<b>RESULTADOS</b>	38
I.- Los efectos no genómicos del 17beta-estradiol en las células beta pancreáticas de ratón están mediados por la proteína quinasa dependiente de GMPc	39

---

II.- Los efectos no genómicos de los estrógenos son a través de la unión con un receptor en la membrana plasmática no relacionado con ER $\alpha$ ni ER $\beta$	41
III.- Un receptor de estrógenos de membrana no clásico produce efectos rápidos opuestos en el páncreas endocrino	43
<b>DISCUSIÓN</b>	45
El Islote de Langerhans y el 17 $\beta$ -estradiol	46
Vía de señalización utilizada por el estradiol en el islote de Langerhans	47
Receptor de estrógenos de membrana no clásico	50
Genómico – Receptor intracelular <i>versus</i>	
No Genómico – Receptor de membrana	55
<b>CONCLUSIONES</b>	57
<b>REFERENCIAS</b>	60
<b>ANEXOS</b>	82
Anexo I	83
Anexo II	95
Anexo III	102

# INTRODUCCIÓN

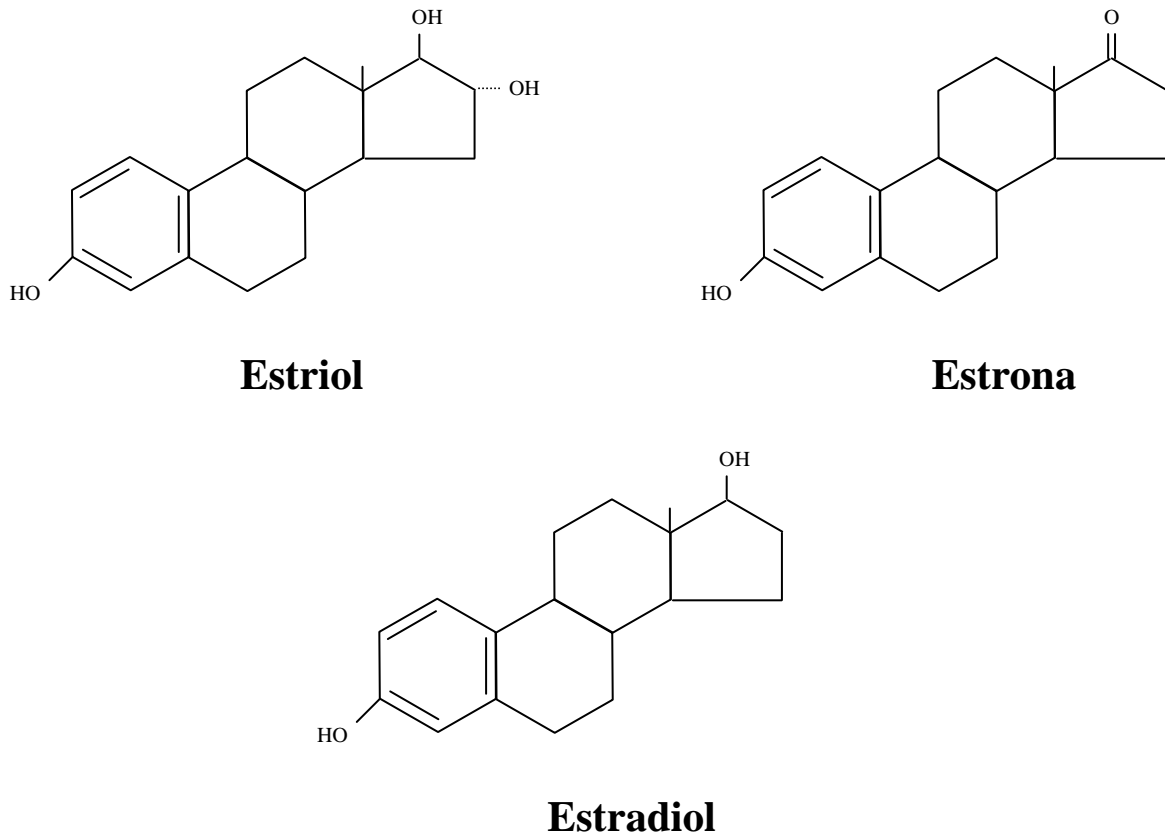
## **I.- ESTRÓGENOS**

La Real Academia de la Lengua Española (<http://www.rae.es>) y la ‘Encyclopaedia Britannica’ (<http://www.britannica.com>) definen ESTRÓGENO como “sustancia que produce el estro o celo de los mamíferos”. Knauer ya demostró en 1900 que los trasplantes ováricos evitaban la atrofia del útero en las conejas ovariectomizadas. Doce años más tarde Adler (1912) obtuvo de los ovarios una sustancia que producía el estro en la conejilla de Indias. La experimentación animal permitió a Doisy (premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1943) y Allen aislar en 1923 un potente estrógeno del líquido folicular del ovario de la cerda. En 1927 Aschheim y Zondek demostraron que la orina de las embarazadas era rica en sustancias estrogénicas y antes de los dos años, Doisy (1929) y Butenandt (1929) anunciaron, casi al mismo tiempo, la cristalización de una sustancia estrogénica que más adelante recibió el nombre de estrona. Al año siguiente, Browne aisló del tejido placentario el estriol. Sin embargo, no fue hasta 1936 cuando el grupo de MacCorquodale cristalizó el estradiol, el más potente de los tres estrógenos {Pritchard & MacDonald 1981}.

En 1936 el ‘Council on Pharmacy and Chemistry of the American Medical Association’ adoptó el término estrógeno en sentido colectivo para designar todas las sustancias capaces de provocar las modificaciones típicas del estro: hipertrofia del útero, cornificación de la vagina e inducción de la conducta de acoplamiento de animales inmaduros o adultos ooforectomizados {Pritchard & MacDonald 1981}.

Se ha demostrado la existencia de más de 20 estrógenos en la orina y el plasma de mujeres embarazadas. Los tres principales son estriol, estrona y estradiol cuya estructura se presenta en la Figura 1. La fuente mayoritaria de estrógenos en la mujer es el ovario y durante la gestación la encargada es la unidad fetoplacentaria. También hay una parte de la biosíntesis que es extraglandular y en todos los casos los estrógenos se obtienen a partir del colesterol. La producción extraglandular, fundamentalmente en la glándula suprarrenal, constituye el mecanismo principal para la formación de estrógenos en las niñas prepuberales, en las mujeres posmenopáusicas y en el hombre adulto joven. En el hombre normal, una pequeña cantidad de estradiol es secretada directamente por los testículos. {Pritchard & MacDonald 1981; Fuchs & Klopper 1982; Hadley 1997; Debuse 1998}.

En mujeres, la concentración de estradiol varía entre 100pg/ml (367pM) en la fase folicular y 600pg/ml (2.2nM) en la ovulación y puede aumentar hasta 20ng/ml (70nM) durante el embarazo. Después de la menopausia, los niveles de estradiol caen a los normales en hombres de edad similar (5-20pg/ml – 18-74pM) {Mendelsohn & Karas 1999}.



**FIGURA 1. Estructura de los tres estrógenos principales**

Los tres estrógenos se sintetizan a partir de colesterol. Tienen la misma estructura básica de esteroide y sólo difieren en los radicales.



## **I.A.- FUNCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS**

### **EFFECTOS GENERALES EN LA MUJER**

Los estrógenos producidos durante la maduración puberal en la mujer son los responsables del desarrollo de los caracteres sexuales femeninos: crecimiento de las mamas, las trompas de Falopio, el folículo ovárico y engrosamiento del epitelio vaginal. Estimulan la actividad del epitelio cervical, de manera que el moco permite con más facilidad la penetración de los espermatozoides. Afectan a la distribución de la grasa y causan retención de agua y sal, aumento de peso, inducen la secreción de las glándulas sebáceas, estimulan el crecimiento del vello púbico y axilar, mantienen la libido y el comportamiento sexual. También estimulan el crecimiento lineal del hueso y el cierre de la epífisis en los animales inmaduros, incluyendo el hombre {Pritchard & MacDonald 1981; Hadley 1997}.

Los estrógenos sintetizados en la glándula suprarrenal y en los testículos también participan en el desarrollo sexual masculino. Esto se ha puesto de manifiesto al estudiar ratones macho carentes (knockout) de  $RE\alpha$  y  $\beta$ . Estos animales presentan un desarrollo normal del aparato reproductor, pero son estériles {Couse et al. 1999} y además ven reducido su comportamiento agresivo y sexual {Ogawa et al. 2000}.

### **CICLO MENSTRUAL**

El ciclo menstrual es el proceso por el cual madura un folículo ovárico, libera un óvulo y si no se produce la fecundación, es expulsado por la vagina junto al endometrio que se había desarrollado para albergar el huevo fecundado.

Durante la fase folicular, primeros 14 días del ciclo, el folículo se desarrolla pasando por distintas etapas hasta que libera el óvulo (ovulación), que viaja al útero en donde puede ser fecundado. Si lo es, se implanta en el endometrio desarrollado durante todo ese tiempo y da lugar a un feto. Si por el contrario no es fecundado, el cuerpo lúteo formado con los restos del folículo tras la expulsión del óvulo, degenera. Ésta es la llamada fase lútea.

El folículo se desarrolla gracias a la secreción de las hormonas LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona estimuladora de los folículos) por la hipófisis. Éstas producen un aumento en la síntesis de estrógenos por el folículo, que por un mecanismo de retroalimentación positiva, estimulan la hipófisis para producir más LH y FSH. La

ovulación coincide con el pico en la secreción de ambas. A continuación, ya en la fase lútea, la secreción de estrógenos disminuye y la LH es la responsable de transformar el folículo roto en el cuerpo lúteo. Éste secreta estrógenos y progesterona, que inhiben la liberación de GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) por el hipotálamo, lo que regula negativamente la secreción de FSH y LH. La progesterona producida por el cuerpo lúteo prepara el tejido endometrial para la implantación del óvulo fecundado. Si por el contrario el óvulo no es fecundado se produce el menstruo, en el cual éste es expulsado junto con el tejido endometrial desarrollado. Tras la menstruación vuelven a disminuir los valores de estrógenos y progesterona, lo que hace que la secreción de FSH y LH por la hipófisis vuelva a aumentar y se incie así un nuevo ciclo {Pritchard & MacDonald 1981; Hadley 1997; Debuse 1998}

## **GESTACIÓN**

Si el óvulo es fecundado se implanta en el endometrio y la placenta en desarrollo empieza a producir gonadotropina coriónica. Esta hormona, cuya acción es similar a la de la LH, induce el crecimiento del cuerpo lúteo impidiendo su degeneración. Éste sigue secretando progesterona y estrógeno hasta que la placenta se hace cargo completamente de su producción, momento en el que el cuerpo lúteo degenera. La continua secreción de progesterona y estrógeno durante todo el embarazo hace que la FSH y la LH hipofisarias no vuelvan a ser secretadas hasta después del parto. Las dos hormonas gonadales secretadas por el cuerpo lúteo o la placenta inician el crecimiento de los tejidos mamarios preparándolos para la lactancia {Fuchs & Klopper 1982; Hadley 1997}.

Los niveles de los tres estrógenos principales aumentan en la sangre materna durante la gestación y descienden bruscamente tras la expulsión del feto y de la placenta. El estradiol asciende desde una media de 7.1ng/ml (26nM) en la semana 22 hasta 23ng/ml (84nM) en la semana 41 {Fuchs & Klopper 1982}.

## **I.B.- RECEPTORES DE ESTRÓGENOS**

### **INTRACELULARES CLÁSICOS**

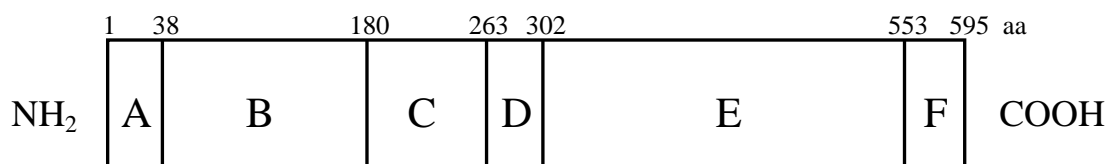
La mayor parte de los efectos de los estrógenos descritos anteriormente están mediados por los receptores de estrógenos intracelulares (RE). Estos pertenecen a una superfamilia de receptores intracelulares con estructura y funcionamiento similares, que incluye el receptor de glucocorticoides, mineralocorticoides, progesterona, vitamina D, hormona tiroidea, andrógenos, ácido retinoico y ácido 9-cis retinoico. Todos ellos son factores de transcripción, funcionalmente activos tras unirse su ligando y que producen efectos genómicos a largo plazo {Evans 1988; Tsai & O'Malley 1994; Kuiper & Gustafsson 1997}.

Aunque ya se había descrito la presencia de proteínas intracelulares capaces de unir estrógenos durante la década anterior, no fue hasta 1986 cuando se clonó el primer receptor de estrógenos a partir de la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 {Walter et al. 1985; Greene et al. 1986; Green et al. 1986}. Más tarde llegaron los de rata {Koike et al. 1987}, pollo {Krust et al. 1986} y ratón {White et al. 1987}. Durante muchos años se creyó en la existencia de un solo receptor de estrógenos. Sin embargo, algunos compuestos relacionados con los estrógenos se comportaban como agonistas o antagonistas dependiendo del tejido {Katzenellenbogen et al. 1996}, así que a partir de 1996 se fueron clonando sucesivamente los RE $\beta$  de rata {Kuiper et al. 1996}, humano {Mosselman et al. 1996} y ratón {Tremblay et al. 1997}. Numerosos estudios se han realizado para saber la diferencia funcional entre los dos receptores {Paech et al. 1997}, la afinidad por sus ligandos {Kuiper et al. 1997; Kuiper et al. 1998}, el comportamiento diferencial de un mismo agonista o antagonista {Barkhem et al. 1998} y la expresión en diversos tejidos {Muramatsu & Inoue 2000}.

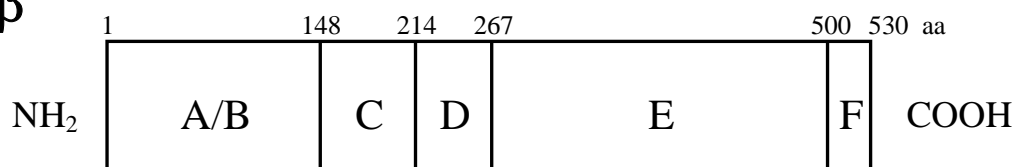
El RE $\alpha$  humano está formado por 595 aminoácidos, con un peso molecular de 66.2kDa {Greene et al. 1986}, mientras que el RE $\beta$  por 530 aminoácidos y 53.2 kDa {Mosselman et al. 1996}. Se han encontrado varios ARNm {McEwen & Alves 1999} por la utilización de diferentes promotores y por procesamiento alternativo de los exones de RE $\alpha$  y RE $\beta$  humanos {Grandien et al. 1993; Flouriot et al. 1998; Moore et al. 1998; Ogawa et al. 1998}, pollo {Griffin et al. 1998} y rata {Hirata et al. 1996; Chu & Fuller 1997; Petersen et al. 1998; Maruyama et al. 1998; Hanstein et al. 1999}. Además se ha detectado la presencia de un receptor de estrógenos de 112 kDa en el córtex de cerebro de

ratón {Asaithambi et al. 1997} y un RE gamma en teleosts, cuyo ARNm tiene un tamaño de 4.6kb y probablemente haya sido generado por duplicación de ER $\beta$ . Éste último es abundante en ovario y testículos, mientras que está ausente o poco expresado en hígado, músculo y cerebro {Hawkins et al. 2000}.

## RE $\alpha$



## RE $\beta$



**FIGURA 2. Representación esquemática de la distribución en dominios de los RE $\alpha$  y RE $\beta$  humanos**

En el esquema se presenta la distribución en dominios de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  humanos, así como la localización de las regiones más importantes para su funcionamiento. También se indican los aminoácidos (aa) a partir de los cuales empieza y termina cada uno de los dominios. AF indica función de transactivación; ADN, zona de interacción con el ADN y HORMONA, el dominio en donde interacciona el estrógeno. Tomado de Dechering et al.2000.

En general, los receptores de hormonas esteroideas presentan una distribución en 6 dominios (A-F) con distinta función (Figura 2). Los extremos amino y carboxi terminales, A/B y E/F respectivamente, poseen función de transactivación. El dominio E es largo y en él se encuentra el sitio de unión del ligando, así como regiones implicadas en la dimerización del receptor y de localización nuclear. En el C hay dos dedos de zinc responsables de la unión al ADN y otras zonas de dimerización. En el dominio D se sitúan las señales de localización nuclear y de transactivación {Beato 1989; Tsai & O'Malley 1994; Dechering et al. 2000}. La homología entre los dos receptores de estrógenos es del 47% en humanos {Enmark et al. 1997} y varía dependiendo del dominio. Los menos

conservados son el A/B, F y D, mientras que el dominio de unión a ADN presenta un 96% de homología y el de unión al ligando del 60%. En otras especies la homología es muy similar {Dechering et al. 2000}.

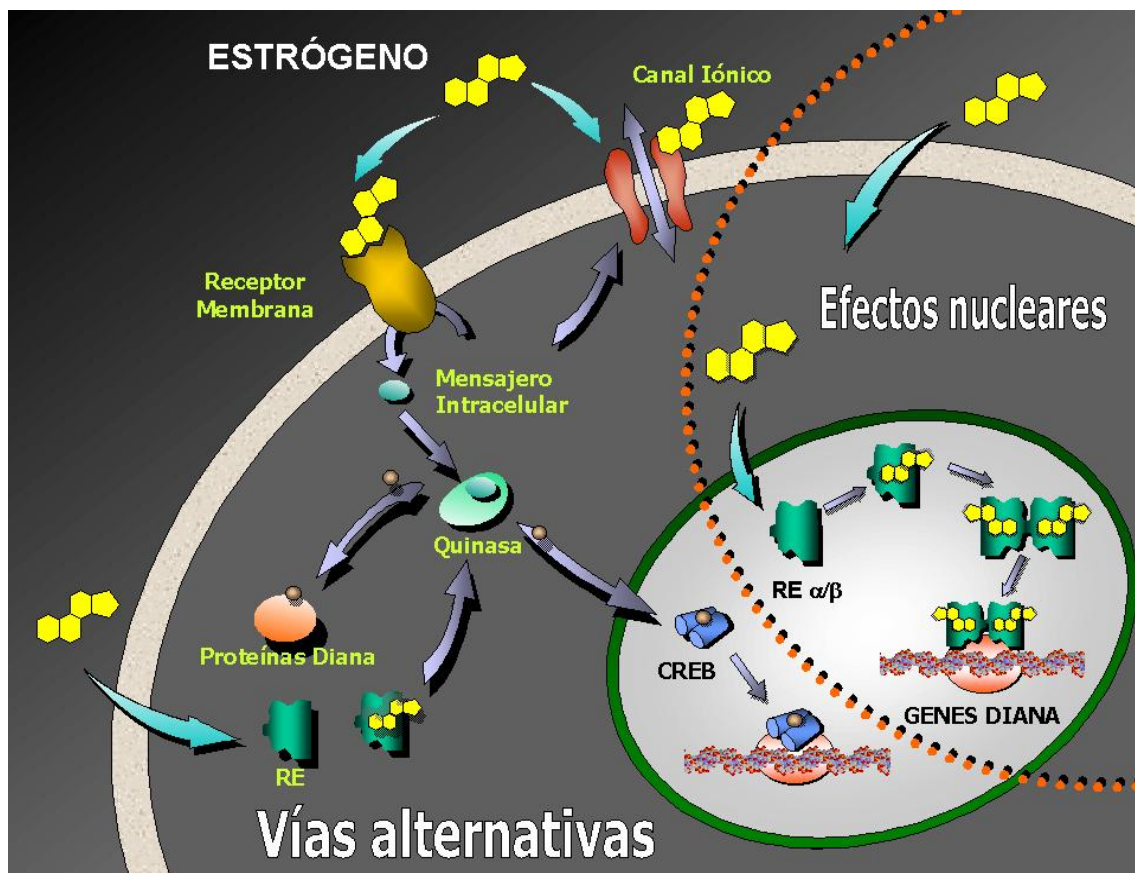
Los receptores de esteroides, ya estén localizados en el citosol o en el núcleo en su forma inactiva, se traslocan al núcleo cuando son activados por la unión de sus ligandos. El RE inactivo es parte de un complejo que incluye chaperonas, Hsp90 (heat shock protein) y Hsp56, que se disocian tras la unión del estrógeno {Pratt & Toft 1997}. Una vez liberado del complejo, el receptor forma homo o heterodímeros que interaccionan con una zona específica del ADN. Esta secuencia consiste en un palíndromo invertido de 15 pares de bases, que se encuentra en la regiones reguladoras de algunos genes. Al situarse sobre esa región específica del ADN, el complejo RE-estrógeno regula la maquinaria de transcripción, bien a través de una interacción directa o bien por medio de otros factores de transcripción {Couse & Korach 1999; Falkenstein et al. 2000}.

## **I.C.-EFECTOS RÁPIDOS DE LOS ESTRÓGENOS**

### **POR VÍAS ALTERNATIVAS**

Los efectos de los estrógenos han estado clásicamente mediados por mecanismos genómicos a través de los receptores intracelulares descritos anteriormente. Estos mecanismos son lentos y son necesarios al menos 20-30 min para detectarse un efecto celular. En el momento de la publicación en 1975 de la primera respuesta rápida a estrógenos en células endometriales {Pietras & Szego 1975}, los términos RE intracelular y mecanismo genómico eran inseparables. Por lo tanto, los efectos rápidos encontrados por Pietras & Szego abrieron un nuevo campo de actuación de estas hormonas hidrofóbicas (Figura 3). De inmediato se sospechó que la transcripción génica podría no estar participando en estos nuevos efectos, por la rapidez con la que se producían, y por tanto también se cuestionó la implicación de los receptores de estrógenos intracelulares. De modo que surgió la idea de la existencia de un receptor en la membrana plasmática que estuviera mediando lo que casi con seguridad se trataba de efectos no genómicos. La hipótesis de un receptor en la membrana fue corroborada dos años más tarde por los mismos autores cuando detectaron sitios de unión para estrógenos en la membrana plasmática de las células endometriales {Pietras & Szego 1977}.

Además de la rapidez con la que se producen los nuevos efectos de los estrógenos, la participación de la vía genómica se descarta con la utilización de inhibidores de la síntesis de ARN y de proteínas. Por otra parte, la implicación de un receptor en la membrana plasmática se demuestra con la utilización de estrógenos unidos a macromoléculas, como BSA o peroxidasa, que les impiden atravesar la membrana plasmática por su gran tamaño y no pueden tener efecto intracelular sobre los receptores clásicos {Ramirez & Zheng 1996; Nadal et al. 1998; Schmidt et al. 2000}.



**FIGURA 3. Mecanismos de acción del estradiol a través de los receptores intracelulares clásicos y de los presentes en la membrana plasmática**

Esta figura ilustra la complejidad de los mecanismos empleados por el estradiol para producir sus efectos: los efectos nucleares clásicos por una parte y además una serie de vías alternativas a través de un receptor en la membrana plasmática, que bien puede producir efectos genómicos como no genómicos. *Figura cedida por el Dr. Mario Díaz.*

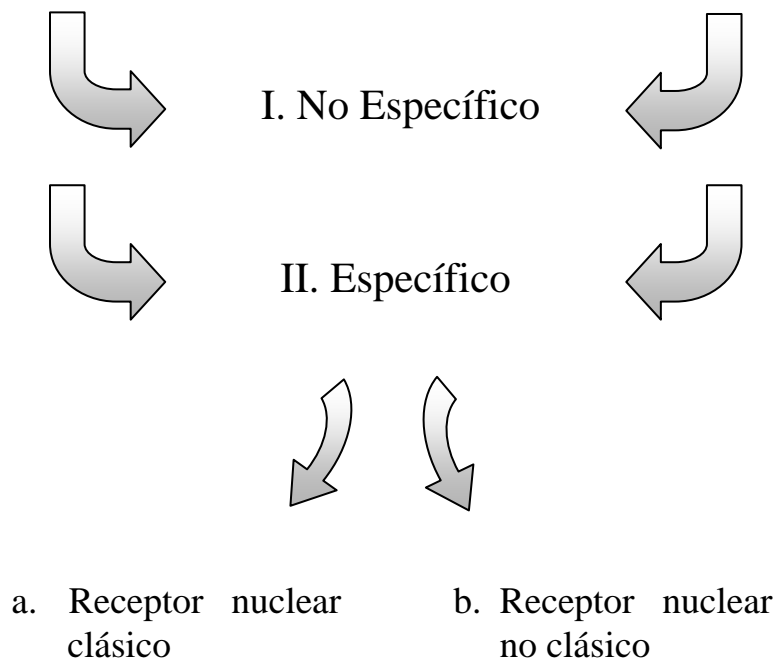
A partir de las primeras evidencias de un nuevo mecanismo de acción de los estrógenos, se dividieron sus efectos en dos. Por un lado los producidos por interacción con los receptores intracelulares, con el resultado de la regulación de la transcripción génica y por el otro, los efectos rápidos, no genómicos, mediados por posibles receptores en la membrana plasmática.

Al contrario de lo que en un principio se creyó, la línea que separa ambos tipos de efectos no es tan nítida, sino que se está viendo entrecruzamiento entre los dos tipos de efectos observados, los mecanismos por los que se producen y los receptores de estrógenos implicados (Figura 3) {Nadal et al. 2001}. No es el objetivo de esta Introducción tratar en detalle estas consideraciones, sino que serán tema de debate en la Discusión de esta tesis. Con el propósito de no dispersar los contenidos que se tratarán en esta Introducción y en la posterior Discusión, se centrará la atención en lo que se ha venido llamando efectos rápidos y no genómicos de los estrógenos. En el caso en el que sea probable que la interacción de los estrógenos con receptores en la membrana plasmática, o que determinados efectos detectados en un corto espacio de tiempo puedan dar lugar a señales genómicas, se discutirán las razones que puedan existir a favor de esa posibilidad.

En vistas de la enorme cantidad de efectos rápidos detectados no sólo con estrógenos, sino también con progesterona, vitamina D, testosterona y aldosterona {Wehling 1997; Alonso & Lopez-Coviella 1998; Schmidt et al. 2000; Falkenstein et al. 2000}, ha sido necesaria establecer una clasificación de los mismos. Ésta se presentó en el “First International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones” que tuvo lugar en Mannheim, Alemania, en 1998 {Norman & Wehling 1999; Falkenstein et al. 2000}. Así, tal y como muestra la Figura 4, los efectos rápidos de los esteroides se dividen en directos (A) e indirectos (B), según el esteroide sea el único agonista o si necesita de otro para generar este tipo de respuesta. A su vez en no específicos (AI, BI) y específicos (AII, BII). Los efectos específicos se dividen en mediados por receptores clásicos (AIIa, BIIa) y no clásicos (AIIb, BIIb).

## A. Efecto Directo

## B. Efecto Indirecto

**FIGURA 4. Clasificación de los efectos rápidos de los esteroides**

Clasificación establecida en el “First International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones” que tuvo lugar en Mannheim, Alemania, en 1998. *Tomado de Falkenstein et al. 2000.*

**EFFECTOS RÁPIDOS DE LOS ESTRÓGENOS**

El  $17\beta$ -estradiol es un modulador de amplio espectro produciendo efectos rápidos, fundamentalmente en los sistemas nervioso {Alonso & Lopez-Coviella 1998} y cardiovascular {Farhat et al. 1996b}, razón por la cual se tratarán aparte. Pero afecta también a otros tipos celulares y sobretodo a las corrientes iónicas, como la del receptor  $P_2X_7$  {Cario-Toumaniantz et al. 1998}, canales de cloro {Hardy & Valverde 1994; Condliffe et al. 2001} y canales de potasio en endotelio {Rusko et al. 1995} y epitelio de colon {McNamara et al. 2000}. Además cierra el  $K_{ATP}$  en células  $\beta$  pancreáticas {Nadal et al. 1998}.

En cuanto al calcio intracelular, el  $17\beta$ -estradiol lo aumenta, tanto procedente del exterior como de los reservorios intracelulares, en numerosos tipos celulares: neuronas embrionarias de rata {Beyer & Raab 1998}, linfocitos T {Benten et al. 1998}, enterocitos



{Picotto et al. 1996}, oocitos {Tesarik & Mendoza 1995}, hueso {Lieberherr et al. 1993; Fiorelli et al. 1996}, células de la granulosa {Morley et al. 1992}, adenocarcinoma de endometrio {Dopp et al. 1999}, hepatocitos {Sanchez-Bueno et al. 1991}, espermatozoides humanos {Luconi et al. 1999}, islote de Langerhans {Nadal et al. 1998} y útero {Batra 1986}.

Otros efectos son la regulación del transporte de glucosa en útero {Welch & Gorski 1999} y la disminución de la síntesis de 11-cetotestosterona inducida por gonadotropina en testículos {Loomis & Thomas 2000}. También modula la comunicación a través de uniones en hendidura (gap junctions) en miocitos {Verrecchia & Herve 1997} y osteoblastos {Massas et al. 1998}. Por su parte, los catecolestrógenos afectan la contracción uterina {Goyache et al. 1995} y la secreción de insulina {Etchegoyen et al. 1998}.

En las células MCF-7, tanto estradiol como E-BSA inhiben la apoptosis inducida por UV y por taxol a través de la activación de c-Jun quinasa y ERK (MAPK). Si bien la exposición al estrógeno es de varias horas, el hecho de que el E-BSA reproduzca los resultados, indica que podría ser a través de un receptor en la membrana plasmática. Sin embargo, en este caso la implicación de c-Jun quinasa y ERK sugieren un mecanismo genómico por el cual el estradiol inhibe la apoptosis, probablemente a través de un receptor de membrana {Razandi et al. 2000a}.

## **VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR ACTIVADAS POR ESTRÓGENOS**

Una evidencia más del nuevo mecanismo de acción de los estrógenos es la implicación de las mismas vías de señalización intracelular que las hormonas hidrofílicas activan a través de receptores de membrana. Entre ellas figuran las del NO, AMPc, GMPc, PKC y proteína G {Wehling 1997; Falkenstein et al. 2000}.

Se ha visto que las proteínas G están implicadas en algunos efectos del 17 $\beta$ -estradiol, ya sea con evidencias directas {Ogata et al. 1996} o indirectas por un aumento en los niveles de AMPc o IP<sub>3</sub>, segundos mensajeros producidos por enzimas activadas por proteínas G, adenilato ciclasa y fosfolipasa C (PLC) respectivamente. Por una parte, el estradiol produce un aumento rápido de AMPc en útero {Szego & Davis 1967; Aronica et al. 1994}, células MCF-7 {Aronica et al. 1994}, intestinales {Picotto et al. 1996}, células de la granulosa {Sirotkin & Nitray 1993} y hueso {Fiorelli et al. 1996}; aunque no siempre

debido a la activación de una proteína G {Farhat et al. 1996a}. En cuanto a la PLC, se ve implicada en los movimientos de calcio intracelular producidos por estradiol en enterocitos de rata junto al AMPc {Picotto et al. 1999}, y las isoformas PLC- $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 modulan el calcio en osteoblastos {Lieberherr et al. 1993; Le Mellay et al. 1997}. Por su parte, los fosfoinosítidos intervienen en el aumento de calcio en células de granulosa {Morley et al. 1992} y los niveles de IP<sub>3</sub> son elevados por estradiol en epitelio vaginal {Singh & Gupta 1997} y en la línea de hepatoma HEPG2, aumento que en este último caso lleva asociada la participación de PKC {Marino et al. 1998}. Además, en MCF-7, el estradiol activa rápidamente la PIP<sub>2</sub>-PLC {Graber et al. 1993} y la PKC está implicada en el efecto estrogénico en condroicitos {Sylvia et al. 1998} y en la regulación de la secreción de Cl<sup>-</sup> en epitelio de colon {Doolan et al. 2000; Condliffe et al. 2001}.

En algunos casos, las vías de PKA y PKC participan en el mismo efecto {Kelly et al. 1999} e incluso se sugiere que la interacción directa del estradiol con la PKC $\delta$  es la responsable de la activación de la adenilato ciclasa, enzima que sintetiza AMPc, en epitelio de colon {Doolan et al. 2000}. IP<sub>3</sub> y AMPc se ven aumentados por la interacción del estradiol con los receptores de estrógenos RE $\alpha$  y RE $\beta$  localizados en la membrana plasmática de células CHO y que parecen acoplados a proteínas G {Razandi et al. 1999}.

Otra vía de señalización que juega un papel importante en algunos efectos rápidos de los estrógenos es la del NO y GMPc. El NO activa la guanilato ciclasa soluble, enzima que sintetiza GMPc {Carvajal et al. 2000}. Un aumento de NO se ha visto en granulocitos {Stefano et al. 2000} y junto al GMPc son fundamentales en los efectos vasodilatadores del estrógeno {Mendelsohn & Karas 1999}. Por otro lado, el estradiol activa la guanilato ciclasa de membrana en PC12, efecto que podría ser directo, puesto que el estrógeno interacciona con una guanilato ciclasa de membrana formada por sus dominios catalítico y quinasa {Chen et al. 1998}.

La vía de las MAPKs es activada de forma rápida por estradiol en células MCF-7 {Migliaccio et al. 1996}, hueso {Endoh et al. 1997} y carcinoma de colon {Di Domenico et al. 1996}. En las MCF-7, la movilización de calcio intracelular determina la activación de MAPK {Improta-Brears et al. 1999}, mientras que en otros casos está implicada una proteína G {Filardo et al. 2000} o la vía de c-src, shc y p21ras {Migliaccio et al. 1996; Migliaccio et al. 2000}. Entre los efectos generados por el estradiol a través de las MAPKs se encuentra la modulación del crecimiento celular {Di Domenico et al. 1996; Morey et al.

1997}, el mantenimiento de la forma y función de las células endoteliales {Razandi et al. 2000b}, la inhibición de la apoptosis {Razandi et al. 2000a} o la activación de la transcripción de c-fos {Watters et al. 1997}. Sin embargo, en el músculo liso vascular, el estradiol y la progesterona inhiben la proliferación celular por un bloqueo rápido de MAPK {Morey et al. 1997}.

La vía de señalización de las MAPKs es una de las responsables de transmitir señales de crecimiento celular y lo hace a través de su función quinasa que fosforila, entre otras, a proteínas reguladoras de la expresión génica {Alberts et al. 1994}. Por lo tanto, aunque se tenga una activación rápida y no genómica de MAPK a través de un receptor de membrana para estradiol, los efectos celulares finales nombrados anteriormente probablemente sean debidos a la activación de la transcripción génica.

## **SISTEMA NERVIOSO**

Mediante estudios clínicos se ha demostrado el papel de los estrógenos en diversas funciones del cerebro y su protección contra la enfermedad de Alzheimer, el estrés y el riesgo de demencia {Garcia-Segura et al. 2001; Wise et al. 2001}. Lo que no se sabe hasta el momento es cuáles de esos y otros efectos están mediados por acciones rápidas de los estrógenos, aunque lo cierto es que el estradiol ejerce una gran variedad de efectos rápidos a lo largo y ancho del sistema nervioso {Ramirez & Zheng 1996; Moss et al. 1997; Zakon 1998}.

El 17 $\beta$ -estradiol modula el potencial de reposo y la actividad eléctrica de neuronas del área preóptica medial {Kelly et al. 1977}, de la amígdala medial {Nabekura et al. 1986; Minami et al. 1990}, neuronas GnRH {Lagrange et al. 1995}, neuronas piramidales CA1 de hipocampo {Wong & Moss 1991}, hipotalámicas {Kelly et al. 1980}, dopaminérgicas {Chiodo & Caggiula 1980} y células de la pituitaria {Dufy et al. 1979}. Regula la liberación de numerosos neurotransmisores y hormonas, como la dopamina y la noradrenalina {Roosen-Runge et al. 1984; Ramirez & Zheng 1996; Disshon & Dluzen 1997; Xiao & Becker 1998; Kim et al. 2000}, prolactina {Zyzek et al. 1981}, LHRH {Drouva et al. 1983}, GnRH y LH {Ramirez & Zheng 1996; Prevot et al. 1999}, oxitocina y vasopresina {Wang et al. 1995}, adrenalina, glutamato, GABA y  $\beta$ -endorfina {Roosen-Runge et al. 1984}. Por otro lado, el estradiol afecta a la respuesta neuronal a  $\mu$ -opioides {Lagrange et al. 1994}, acetilcolina {Uki et al. 1999}, kainato {Gu & Moss 1996}, GABA

{Lagrange et al. 1996} y serotonina {Wetzel et al. 1998}. En córtex, modula la actividad de la calcio-ATPasa {Zylinska et al. 1999}.

En el sistema nervioso, la vía de señalización más generalmente implicada en el efecto del estradiol es la del AMPc-PKA por medio de proteína G. Receptores de estrógenos acoplados a proteínas G participan en el hipocampo, tanto en la disminución de la corriente de calcio {Mermelstein et al. 1996}, como en la modulación de las corrientes inducidas por kainato en neuronas CA1 {Gu & Moss 1996}. En este último caso es necesario también un efecto interno del estradiol actuando sobre el AMPc {Gu & Moss 1998}. La implicación de una proteína G se ha puesto de manifiesto también en hipotálamo {Caldwell et al. 1999} y la PKA es la responsable de la regulación del efecto de  $\mu$ -opioides por estradiol en neuronas hipotalámicas {Lagrange et al. 1997}.

Sin embargo, también hay otras vías responsables de algunos de los efectos rápidos del estradiol en el sistema nervioso, como es la del NO y la guanilato ciclasa soluble, que participan en la secreción de GnRH {Prevot et al. 1999}. Las MAPKs son activadas por estradiol en neuroblastoma {Watters et al. 1997} y córtex {Singer et al. 1999} en donde estimula el crecimiento celular y protege las neuronas corticales de la toxicidad del glutamato {Singh et al. 1999} y las neuronas de hipocampo de la toxicidad del kainato o del NMDA {Bi et al. 2000}.

## **SISTEMA CARDIOVASCULAR**

Uno de los grandes beneficios que proporcionan los estrógenos a las mujeres es la protección cardiovascular. La incidencia de este tipo de enfermedades es menor en las mujeres premenopáusicas que en los hombres, aunque esta diferencia se ve claramente disminuida tras la menopausia, protección que se recupera con la terapia hormonal con estrógenos {Farhat et al. 1996c}.

Al menos parte de ese beneficio es gracias al efecto vasodilatador de los estrógenos a través de mecanismos no genómicos {Farhat et al. 1996c; Mendelsohn & Karas 1999}. Esta vasodilatación puede ser dependiente o independiente del endotelio. La independiente de endotelio está mediada por la disminución de la corriente de calcio de tipo L por estradiol {Zhang et al. 1994; Kitazawa et al. 1997; Tanabe et al. 1999} o por un aumento de NO en células de músculo liso. El NO genera GMPc a través de la guanilato ciclasa soluble {Mugge et al. 1993}, lo que activa la PKG, responsable de la apertura del canal de potasio de alta conductancia activado por calcio {White et al. 1995; Darkow et al. 1997}.

El aumento de la corriente de potasio hiperpolariza la membrana plasmática, disminuye la entrada de calcio y por tanto produce la relajación del vaso sanguíneo {Nelson & Quayle 1995}. También se ha visto interacción directa del estradiol con el canal de potasio, lo que aumenta la corriente que pasa a su través, con el mismo efecto sobre la contracción {Valverde et al. 1999}. Tampoco se puede descartar la participación adicional del AMPc, puesto que éste aumenta en músculo liso tras exposición a estradiol {Mugge et al. 1993; Farhat et al. 1996a; Buitrago et al. 2000}.

La vasodilatación dependiente de endotelio está mediada por la liberación de NO de las células endoteliales {Mendelsohn & Karas 1999}, que actuaría sobre las células del músculo liso. El estradiol aumenta el NO {Lantin-Hermoso et al. 1997; Caulin-Glaser et al. 1997; Kim et al. 1999} por la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), probablemente por su fosforilación por (PI3)-kinase-Akt {Haynes et al. 2000}. Tras la exposición a estradiol y de una forma dependiente de un aumento de calcio intracelular {Moini et al. 1997}, eNOS se trasloca desde la membrana a una zona próxima al núcleo {Goetz et al. 1999}. El NO producido aumenta GMPc {Russell et al. 2000a}, lo que activaría la PKG, responsable de la apertura del canal de potasio dependiente de calcio y por tanto produciría la relajación de las células del músculo liso. También se implica la vía de MAPK en el aumento de la liberación de NO de las células endoteliales {Russell et al. 2000b}.

## **I.D.- RECEPTOR DE ESTRÓGENOS DE MEMBRANA**

Gran parte de los efectos descritos anteriormente están mediados por la acción del estradiol sobre la membrana plasmática, según se ha demostrado con la utilización de estradiol unido a macromoléculas. Los compuestos que resultan, estradiol-BSA (E-BSA) y estradiol-peroxidasa, no pueden atravesar la membrana plasmática por su gran tamaño, de modo que tanto los efectos como el marcaje que se obtienen son producto de la interacción del estradiol con un sitio de unión en la membrana {Ramirez 1992; Nadal et al. 1998; Schmidt et al. 2000}. El compuesto más empleado ha sido E-BSA, aunque su utilización no está exenta de controversia, puesto que el E-BSA comercial contiene cantidades considerables de estradiol libre. Además, activa ERK1 y ERK2 en células de neuroblastoma, efecto no reproducido con estradiol libre y no se une a los RE $\alpha$  y  $\beta$

presentes en el extracto de citosol de células de insecto que los sobrexpresan {Stavis et al. 1999}. Por esta razón se ha utilizado estradiol unido a peroxidasa como una alternativa para ensayos de interacción y de funcionalidad del receptor de membrana {Nadal et al. 2000}.

Los primeros sitios de unión para estrógenos en la membrana plasmática se detectaron en células de endometrio {Pietras & Szego 1977} y en espermatozoides humanos {Hernandez-Perez et al. 1979; Cheng et al. 1981}. Sucesivamente se han ido viendo en membrana plasmática sináptica de cerebro de rata {Towle & Sze 1983} y pituitaria {Bression et al. 1986}. E-BSA se ha utilizado en células de cáncer humano {Berthois et al. 1986}, hueso {Brubaker & Gay 1994; Fiorelli et al. 1996}, neuronas neostriales {Mermelstein et al. 1996}, cerebro de rata {Ramirez & Zheng 1996}, la línea tumoral de pituitaria GH3/B6, {Pappas et al. 1995} y células endoteliales {Kim et al. 1999}. También se ha empleado microscopía electrónica para poner de manifiesto la interacción E-BSA con la membrana plasmática de células de hepatoma {Moats & Ramirez 2000}. En células  $\beta$  pancreáticas se ha sustituido este compuesto por estradiol-peroxidasa {Nadal et al. 2000} y un derivado biotinilado de estradiol ha servido para ver marcaje en membrana en células MCF-7 {Germain et al. 1993}.

Por otro lado, se ha visto unión de 2OH-estradiol a membranas de pituitaria {Schaeffer et al. 1980; Bression et al. 1986}, hipotálamo {Etchegoyen et al. 1986} y carcinoma de mama {Vandewalle et al. 1988}.

A pesar de los numerosos ejemplos de interacción de los estrógenos con un receptor en la membrana plasmática, no hay una conclusión clara de la naturaleza de dicho receptor. Si bien en algunos tipos celulares parecen ser los propios receptores de estrógenos intracelulares que se expresan en la membrana plasmática, en otros casos se trata de otro receptor que no guarda ninguna relación con los clásicos.

Para estudiar la naturaleza del receptor de estrógenos de membrana, se cuenta con los anticuerpos dirigidos contra los RE clásicos  $\alpha$  y  $\beta$ , que permiten determinar la presencia o no de estos receptores en la membrana plasmática. Una fuente importante de evidencias a este respecto son los animales carentes (knockout) de RE $\alpha$  y RE $\beta$ . A pesar de que ya se han obtenido ratones que carecen de ambos receptores {Couse et al. 1999; Ogawa et al. 2000}, aún no se han obtenido datos de los efectos de membrana del estradiol en esos animales. Sin duda esos estudios serán decisivos para clarificar cuáles de esos

efectos del estrógeno están mediados por RE $\alpha$  o RE $\beta$  y cuáles por otros receptores de membrana.

## **EL RECEPTOR CLÁSICO EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA**

La sobreexpresión de los RE $\alpha$  y  $\beta$  en células CHO ha permitido ver un 2% de localización en la membrana plasmática. Estas proteínas de membrana tienen el mismo peso molecular y provienen del mismo ARNm que los RE intracelulares. Esto demuestra una cierta capacidad de los receptores de estrógenos intracelulares para expresarse en la membrana plasmática, sin modificaciones aparentes en su estructura ni la presencia de dominios adicionales. A través de estos receptores de membrana clásicos, el estradiol activa dos tipos de proteínas G, Gq y Gs {Razandi et al. 1999}.

Con anticuerpos dirigidos contra diferentes dominios del RE $\alpha$  se ha visto marcaje en membrana en una población de células de la línea tumoral de pituitaria GH3/B6 {Pappas et al. 1995; Norfleet et al. 1999} y en neuronas de hipocampo {Clarke et al. 2000}. Uno de esos anticuerpos reproduce la estimulación de la liberación de prolactina generada por estradiol en las células GH3/B6 {Norfleet et al. 2000}. Por otro lado, la unión de E-BSA a la membrana de células de músculo liso es competida por el anticuerpo que reconoce el dominio de unión del ligando al RE $\alpha$  {Morey et al. 1997}.

El bloqueo de los efectos rápidos del estradiol con el antiestrógeno específico para RE $\alpha$  y  $\beta$ , ICI 182,780, proporciona evidencias de la implicación de al menos uno de ellos en dichos efectos del estrógeno {Wakeling et al. 1991}. Esto sucede en el aumento del calcio intracelular producido por estradiol en células de adenocarcinoma de endometrio {Dopp et al. 1999}, la activación de la vía de NO en endotelio {Goetz et al. 1999; Kim et al. 1999; Chen et al. 1999; Chambliss et al. 2000; Haynes et al. 2000} y la protección frente a la apoptosis en MCF-7 {Razandi et al. 2000a}. ICI también bloquea la activación de la vía de señalización de MAPK por estradiol en MCF-7 {Migliaccio et al. 1996; Improta-Brears et al. 1999}, carcinoma de colon {Di Domenico et al. 1996} y células endoteliales {Russell et al. 2000b}.

Cuando se sobreexpresa el RE $\alpha$  en células endoteliales, se obtiene un aumento de la activación de eNOS por estradiol mucho mayor que el que se da en las células con niveles de expresión normales. En ambos casos, la activación de eNOS por estradiol es inhibida por el antiestrógeno ICI 182,780 {Chen et al. 1999}.

Por otro lado, los anticuerpos dirigidos contra el RE $\alpha$ , en un intento por aislar el receptor de estrógenos de membrana, han permitido obtener algunas bandas de diferentes pesos moleculares. Con un anticuerpo dirigido contra el dominio de unión del estradiol se ha detectado una banda de 29kDa en espermatozoides humanos, cuyo peso molecular es muy inferior al del RE intracelular {Luconi et al. 1999}. Con otros anticuerpos también se ha detectado la misma banda en útero, junto a otras de distintos pesos moleculares {Monje & Boland 1999}. Además, el estradiol interacciona con un receptor de progesterona de membrana de 29kDa presente en cerebelo {Bukusoglu & Krieger 1994}. También en distintos extractos de cerebro se han obtenido varias bandas con E-BSA, en donde una de ellas corresponde a una subunidad de F0F1-ATPasa/ATPsintasa mitocondrial, que da sensibilidad a la oligomicina {Ramirez & Zheng 1996; Zheng & Ramirez 1999}.

La obtención de las bandas mencionadas anteriormente a partir de extractos de membranas con los anticuerpos anti-RE $\alpha$ , favorece la hipótesis de la presencia de los receptores intracelulares en la membrana plasmática. El hecho de que las proteínas posean distinto peso molecular que el RE $\alpha$ , sugiere la idea de que pueda tratarse de receptores que han sufrido modificaciones, aunque éstas les han dejado intactas las estructuras reconocidas por los respectivos anticuerpos utilizados.

## **RECEPTOR DE MEMBRANA NO CLÁSICO**

La presencia del RE $\alpha$  ó  $\beta$  en la membrana plasmática de algunos tipos celulares no da cuenta de todos los efectos de los estrógenos. Estos se siguen produciendo en células de cáncer de mama que naturalmente no expresan ninguno de los dos receptores clásicos {Filardo et al. 2000} y en hipocampo de ratones carentes (knockout) del RE $\alpha$ . En este caso, la participación del RE $\beta$  es descartada por la falta de inhibición del efecto del estradiol por ICI 182,780 {Gu et al. 1999}. Tampoco hay diferencia en la activación de ERK por estradiol en córtex cerebral de ratones sin RE $\alpha$  con respecto a los normales, aunque en este caso no está clara la implicación de un receptor de membrana {Singh et al. 2000}. Por otro lado, en macrófagos que no expresan el RE $\beta$ , IC-21, anticuerpos anti-RE $\alpha$  no marcan la membrana plasmática {Benten et al. 2001} y la relajación producida por estradiol en aorta de ratones carentes del RE $\beta$  no es menor que en los animales normales {Nilsson et al. 2000}.

Por otra parte, el antiestrógeno ICI 182,780 no inhibe el efecto del estradiol en neuronas dopaminérgicas {Beyer & Karolczak 2000}, tampoco la relajación de arterias



pequeñas coronarias {Shaw et al. 2000}, ni el aumento de NO en granulocitos {Stefano et al. 2000}. También es inefectivo en la activación de la vía de MAPK en neuroblastoma {Watters et al. 1997} e hipotálamo {Kuroki et al. 2000}. En el caso de neuronas corticales, tanto un mecanismo dependiente como uno independiente de RE $\alpha$  y RE $\beta$  se han descrito {Singer et al. 1999; Singh et al. 1999}.

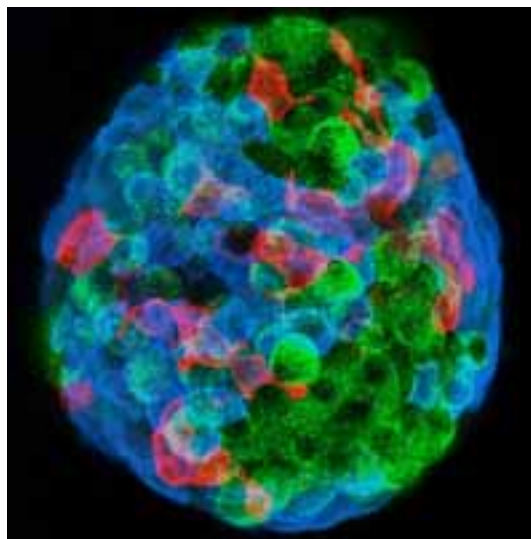
Con respecto a la naturaleza de ese receptor de membrana distinto de los intracelulares, cabe dos posibilidades. Por un lado, podría ser un receptor cuyos ligando sean conocidos y que además interaccione con estradiol. Y por otra, podría tratarse de un receptor nuevo completamente desconocido. En cualquiera de los dos casos, identificarlo no es una tarea sencilla, aunque se tenga descartada completamente la participación de los receptores intracelulares.

Entre otras proteínas con las que se ha visto unión del 17 $\beta$ -estradiol se encuentra la guanilato ciclasa de membrana: el estrógeno interacciona con una proteína que consiste en sus dominios intracelulares quinasa y catalítico {Chen et al. 1998}. Además el estrógeno también se une a la glicoproteína P cuando ésta es expresada en células NIH 3T3 {Edelmann et al. 1999}.

Por otro lado existe la modulación alostérica de receptores de neurotransmisores por esteroides. Aunque no se tienen datos de una modulación alostérica del receptor del ácido gamma-aminoburítico (GABA) por estradiol, los catecolestrógenos disminuyen su unión a membranas hipotalámicas {Etchegoyen et al. 1986} y otros esteroides inhiben la interacción del t-butilbicyclo-fosforotionato al complejo del receptor GABA {Majewska et al. 1986}. El sulfato de pregnenolona, pero no el estradiol, aumenta la probabilidad de apertura del canal de NMDA en parches aislados {Wong & Moss 1994} y la progesterona compite por el receptor muscarínico M2 {Wilkinson et al. 1995}. Sin embargo, el estradiol sí interacciona con la proteína transportadora de serotonina (SERT) de forma alostérica, aunque en un lugar inaccesible desde el dominio extracelular {Chang & Chang 1999}. Otros receptores con los que también interacciona el estradiol son el receptor de serotonina tipo 3 {Wetzel et al. 1998} y los receptores de opioides {Schwarz & Pohl 1994}.

## II.- EL ISLOTE DE LANGERHANS

El islote de Langerhans es una estructura formada por varios miles de células, muy inervada e irrigada por capilares sanguíneos, que se encuentra localizada en el páncreas endocrino. Su función principal es la regulación de la homeostasis de glucosa en sangre. Para ello cuenta con las hormonas secretadas por los cuatro tipos celulares que lo constituyen {Orci & Unger 1975; Ashcroft & Rorsman 1989} (Figura 5).



**FIGURA 5. Islote de Langerhans de ratón**

Esta imagen muestra un islote de Langerhans de ratón en el que se identifican tres de los tipos celulares presentes en el islote, por medio de técnicas de inmunocitoquímica. Para ello se han empleado anticuerpos dirigidos contra las hormonas secretadas por las células  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ , cada uno marcado con un color distinto. Así se tiene que el glucagón de las células  $\alpha$  está teñido en azul; la insulina de las células  $\beta$  se tiene en verde y la somatostatina sintetizada por las células  $\delta$  está en rojo. Tomado de: R.L. Sorenson y T.C. Brelje. *Department of Cell Biology and Neuroanatomy. University of Minnesota.* (<http://www.novo.dk/hri>).

\* Las células alfa ( $\alpha$ ) son las encargadas de la secreción de glucagón y representan el 15-20% de la población celular del islote. Se localizan principalmente en la periferia del islote.

\* Las células beta ( $\beta$ ) forman la población mayoritaria, 65-90%, y son las responsables de la secreción de insulina.

\* Las células delta ( $\delta$ ) son las productoras de somatostatina y constituyen entre un 3 y un 10% del total celular del islote. Este tipo celular, al igual que las células  $\alpha$ , se distribuye preferentemente en la periferia del islote.

\* Las células PP, que contienen el polipéptido pancreático P constituyen el 1% celular restante.

## **I.A.- LA CÉLULA BETA PANCREÁTICA**

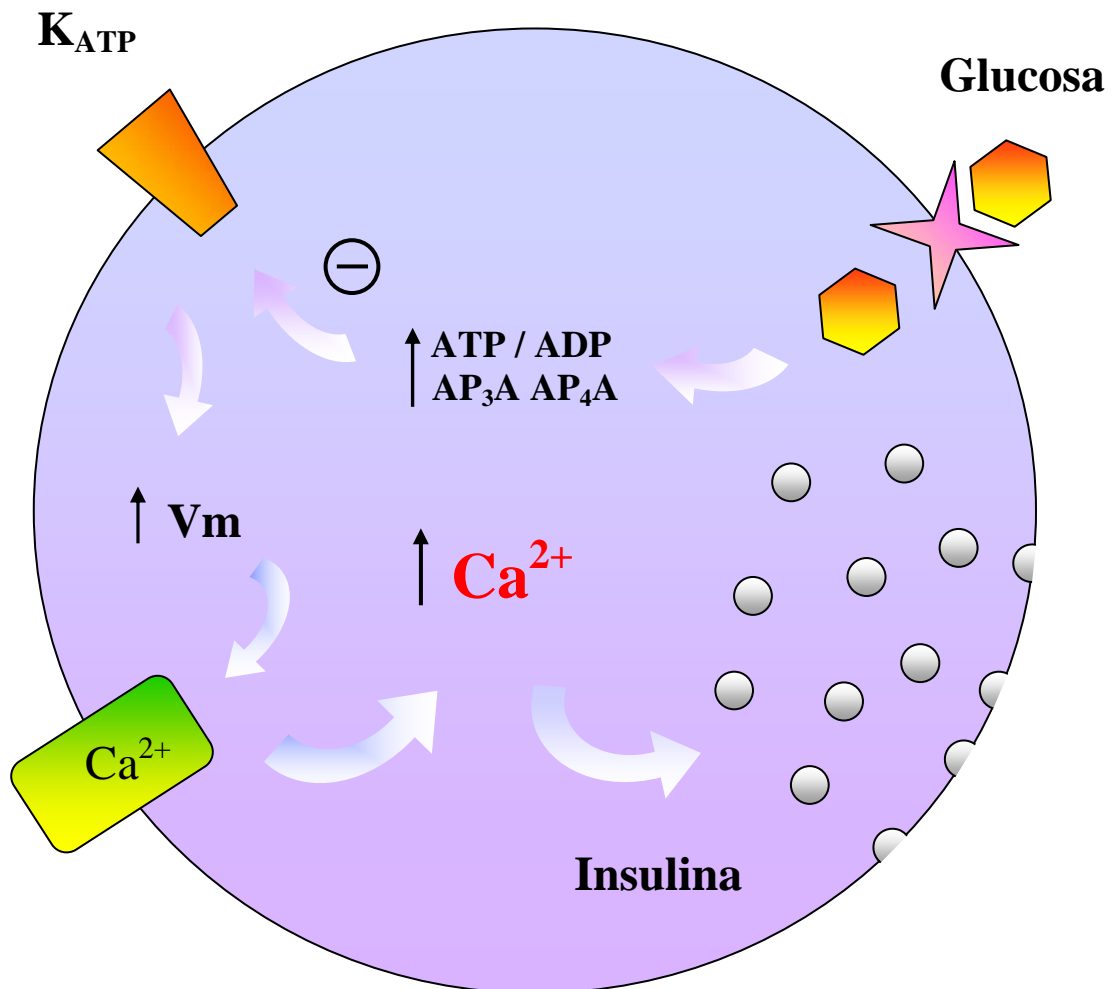
La célula  $\beta$  pancreática es la población celular mayoritaria dentro del islote de Langerhans. La fisiología y el acoplamiento estímulo-secreción de este tipo celular ha sido muy estudiado a lo largo de los años, lo que ha hecho que el mecanismo por el que se regula la secreción de insulina sea bien conocido.

Las células  $\beta$  secretan insulina en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre. Esa secreción es modulada por concentraciones variables de glucosa extracelular por medio de un proceso en el que participan el metabolismo de la glucosa, varios tipos de canales iónicos, la actividad eléctrica de la membrana plasmática y la maquinaria exocítica. Además, otras vías de señalización intracelular pueden intervenir en el mecanismo de liberación de insulina por glucosa en la célula  $\beta$ .

### **SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR GLUCOSA**

La glucosa que llega a los islotes a través de los capilares sanguíneos que los irrigan alcanza el citosol de las células  $\beta$  gracias al transportador específico GLUT-2. La glucosa es entonces fosforilada por la hexoquinasa IV y queda así atrapada en el interior celular. Su metabolismo produce un aumento intracelular del cociente ATP/ADP y de los diadenosín polifosfatos {Ripoll et al. 1996}, lo que cierra los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ). Estos canales son los responsables de mantener el potencial de reposo de la célula  $\beta$  {Ashcroft et al. 1984; Mislér et al. 1986; Dunne & Petersen 1986}. El número de  $K_{ATP}$

cerrados cuando la concentración de glucosa es superior a 5-7mM es suficiente para alcanzar el umbral de despolarización de la membrana plasmática necesario para generar actividad eléctrica {Dean & Matthews 1968}. Esta actividad eléctrica sigue un patrón oscilatorio con superposición de potenciales de acción sobre las mesetas de las oscilaciones, con una primera oscilación más duradera que el resto {Santos et al. 1991}.



**FIGURA 6. Mecanismo de la secreción de insulina inducida por glucosa**

En este esquema se representan los principales eventos: el metabolismo de la glucosa, el cierre del KATP, la despolarización de la membrana plasmática el aumento de la concentración de calcio intracelular a través de los canales dependientes de voltaje y la secreción de insulina.

La despolarización de la membrana abre los canales de calcio dependientes de voltaje de la membrana plasmática de las células  $\beta$ . Esto produce un aumento de la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) que desencadena la exocitosis a través de la activación de proteínas quinasas que interaccionan con componentes de la maquinaria microtubular/exocítica. Durante este proceso se libera el contenido de insulina de las vesículas al medio extracelular {Aizawa et al. 1998} y la hormona alcanza el torrente sanguíneo, donde actúa sobre los tejidos diana como comunicador de la presencia de glucosa en la sangre (Figura 6) {Ashcroft & Rorsman 1989}.

### **EL CANAL DE POTASIO DEPENDIENTE DE ATP ( $K_{ATP}$ )**

El canal de potasio dependiente de ATP ( $K_{ATP}$ ) está presente en las células  $\beta$  y  $\delta$  pancreáticas y en otros varios tejidos. Está formado por dos tipos de subunidades, SUR y Kir, de las que hay varias isoformas. Su modulación varía dependiendo de las subunidades que lo componen en cada tipo celular {Nelson & Quayle 1995; Yokoshiki et al. 1998; Aguilar-Bryan et al. 1998; Ashcroft & Gribble 1999}.

El ATP y las sulfonilureas tolbutamida y glibenclamida son inhibidores del  $K_{ATP}$ , mientras que el ADP, GDP, UDP y el diazóxido lo activan {Yokoshiki et al. 1998}. El  $K_{ATP}$  es regulado por proteína G, PKA y PKC, aunque queda por determinar si es por medio de una modulación directa por fosforilación o si se trata de un mecanismo indirecto {Nelson & Quayle 1995}. En el caso de las dos subunidades presentes en la célula  $\beta$  pancreática, SUR1 y Kir6.2, la PKA fosforila directamente ambas subunidades y además se sabe en qué aminoácidos {Beguin et al. 1999; Lin et al. 2000}.

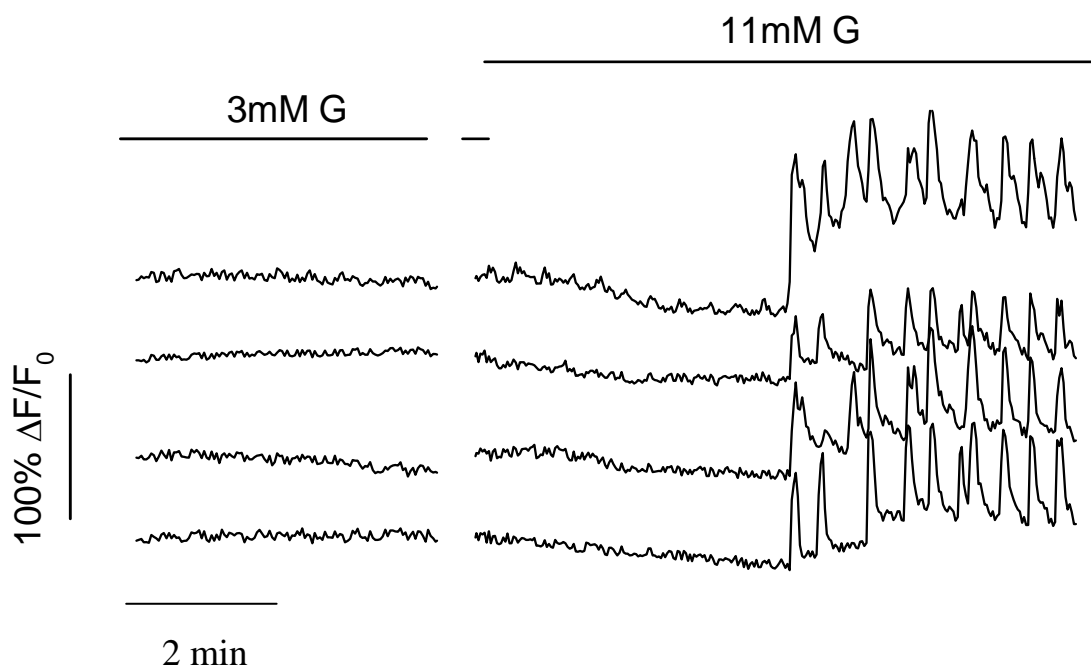
En la célula  $\beta$  del islote de Langerhans el  $K_{ATP}$  es el responsable de mantener el potencial de reposo, debido a que la suya es la principal corriente iónica que atraviesa la membrana plasmática en presencia de una concentración no estimuladora de glucosa. El cierre de este canal por distintos estímulos produce la disminución de la corriente de salida de potasio y por tanto la despolarización de la membrana plasmática {Henquin 1980} y el resto de eventos que ya han sido descritos anteriormente.

### **EL CALCIO INTRACELULAR EN LA CÉLULA BETA**

El calcio es un mensajero intracelular ampliamente estudiado en la mayoría de los tipos celulares y que participa en multitud de procesos. Su importancia como principal

mediador en la secreción de insulina inducida por glucosa está bien establecido {Wollheim & Sharp 1981; Prentki & Matschinsky 1987}.

La medida de calcio intracelular utilizando sondas fluorescentes sensibles a calcio ha permitido estudiar la respuesta del islote de Langerhans a glucosa. Con esta técnica se ha visto que al pasar de 3mM a 11mM glucosa, los islotes de Langerhans de ratón generalmente responden con una primera elevación del calcio intracelular en el que éste permanece elevado durante 2-3min, para luego oscilar sobre un nivel basal mayor que el que había con 3mM {Valdeolmillos et al. 1989}. La frecuencia de las oscilaciones está comprendida entre 2 y 5  $\text{min}^{-1}$  (Figura 7). A medida que la concentración de glucosa aumenta también lo hace la duración de las oscilaciones, hasta que se tiene un aumento sostenido del calcio intracelular cuando la concentración de glucosa es superior a 22mM.



**FIGURA 7. Oscilaciones de calcio intracelular en cuatro células  $\beta$  individuales dentro del islote**

En la figura se presenta la respuesta de calcio intracelular de cuatro células  $\beta$  localizadas dentro del mismo islote, al pasar de 3mM a 11mM glucosa. Los islotes han sido cargados con la sonda fluorescente Fluo-3 y la señal de calcio se ha obtenido con microscopía confocal. *Tomada y modificada con permiso de Nadal et al. 1999.*

Las oscilaciones de calcio en el islote de Langerhans se producen de forma paralela a la actividad eléctrica oscilatoria de las células  $\beta$  dentro del islote, en respuesta a alta glucosa, hecho que se ha puesto de manifiesto al registrar ambos parámetros simultáneamente {Santos et al. 1991}. Como resultado, la secreción de insulina es pulsátil y paralela a las oscilaciones de calcio intracelular {Rosario et al. 1986; Barbosa et al. 1996; Barbosa et al. 1998}.

El calcio que aumenta en el citosol de las células  $\beta$  en respuesta a glucosa proviene del exterior celular, mientras que no hay participación del calcio de los reservorios intracelulares. Esto se ha puesto de manifiesto con experimentos en los que se ha utilizado o bien un medio extracelular carente de calcio o bien bloqueantes de los canales de calcio de la membrana plasmática. En ambos casos no se tiene aumento de calcio intracelular en respuesta a alta concentración de glucosa {Valdeolmillos et al. 1989; Gilon & Henquin 1992}, ni tampoco secreción de insulina {Wollheim & Sharp 1981; Prentki & Matschinsky 1987}.

La razón fundamental por la que ha sido tan estudiado el proceso de acoplamiento estímulo-secreción en la célula  $\beta$  pancreática ha sido porque, además de representar la población celular mayoritaria dentro del islote, los movimientos de calcio intracelular registrados en el islote de Langerhans son reflejo de lo que sucede en las células  $\beta$ . Esto es así porque a pesar de la heterogeneidad existente entre las células  $\beta$  individuales de un mismo islote {Salomon & Meda 1986; Kiekens et al. 1992; Pipeleers 1992}, una vez se encuentran localizadas dentro de él, están acopladas y actúan como un sincitio en términos de actividad eléctrica y de calcio intracelular (Figura 7) {Santos et al. 1991; Valdeolmillos et al. 1993; Nadal et al. 1999}. Esto hace que se sume la señal de calcio de todas las células  $\beta$  y pueda ser detectada al registrar la señal de todo el islote. Este acoplamiento hace además que la secreción de insulina producida por islotes de Langerhans sea mayor que la de las células aisladas {Pipeleers et al. 1982; Halban et al. 1982}.

## **VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR ACTIVADAS POR GLUCOSA**

Además de la modulación del  $K_{ATP}$  que desencadena actividad eléctrica y aumento del calcio intracelular por la glucosa, ésta también activa vías de señalización intracelular que participan en la secreción de insulina a otros niveles.

El papel del AMPc y la PKA en la secreción de insulina por glucosa no está clara. Si bien se produce un modesto aumento de AMPc en respuesta a glucosa en ratones {Grill & Cerasi 1973; Charles et al. 1975; Sharp 1979; Thams et al. 1988}, éste parece no estar implicado en la secreción en rata {Persaud et al. 1990}. Sin embargo, no hay duda de que la activación de esa vía potencia la secreción de insulina {Christie & Ashcroft 1984}, a través de dos mecanismos: por un aumento en el calcio intracelular {Yaekura et al. 1996} y por un efecto directo sobre la maquinaria secretora {Ammala et al. 1993; Gillis & Misler 1993}. Algunos secretagogos como GLP-1 (péptido similar al glucagón 1) {Gefel et al. 1990}, GIP (polipéptido inhibitorio gástrico) {Dachicourt et al. 1996; Ding & Gromada 1997} y PACAP {Klinteberg et al. 1996} actúan vía AMPc.

La glucosa induce secreción de insulina en islotes de Langerhans de rata por medio del GMPc. Además de que la glucosa aumenta los niveles de GMPc, la inhibición de la guanilato ciclasa soluble que lo sintetiza bloquea la secreción de insulina por glucosa {Laychock et al. 1991; Jones et al. 1992; Green et al. 1993}. Aunque no se sabe de una forma precisa sobre qué punto del proceso actúa el GMPc, se ha visto que aumenta tanto la utilización de glucosa {Laychock 1987} como el calcio intracelular en los islotes {Lee & Laychock 1997}. Sin embargo, algunos estudios ponen en duda la contribución positiva del GMPc en la secreción de insulina {Vara & Tamarit-Rodríguez 1991}.

El papel del NO en la secreción de insulina inducida por glucosa no está claro. Aunque por un lado se le implica en el inicio de la secreción de insulina {Spinas et al. 1998}, por el otro, compuestos que liberan NO dentro de las células  $\beta$  producen una disminución de la secreción de insulina {Cunningham et al. 1994}. Ese efecto del NO está mediado por la apertura del  $K_{ATP}$  y la inhibición de la actividad eléctrica {Tsuura et al. 1994; Krippeit-Drews et al. 1995}.

Por otra parte, la glucosa induce la traslocación de  $PKC\alpha$  a la membrana plasmática y se le atribuye cierta participación en la secreción de insulina en islotes de rata {Ganesan et al. 1990; Ganesan et al. 1992; Newgard & McGarry 1995}. Los agonistas muscarínicos, forbol ésteres y agonistas colinérgicos actúan vía PKC {MacDonald & Fahien 1988; Jones et al. 1991}.

El papel de las tirosina quinasa en la secreción de insulina inducida por glucosa es muy controvertido {Jones & Persaud 1998} y la vía de las MAPKs es activada por glucosa en rata aunque no estimula la liberación de insulina {Persaud et al. 1996; Burns et al. 1997}. Tampoco la PI3-quinasa participa en ese proceso {Straub & Sharp 1996}, aunque sí la quinasa dependiente de calcio/calmodulina II {Wenham et al. 1994}.



## **II.B.- LA CÉLULA ALFA PANCREÁTICA**

Así como el acoplamiento estímulo-secreción en la célula  $\beta$  pancreática ha sido muy estudiado, dicho proceso en la célula  $\alpha$  es bastante menos conocido. Esto se debe fundamentalmente a que representa tan sólo entre un 15 y un 20% de la población total del islote y a que las células  $\alpha$  no están acopladas y por tanto no se comportan de forma sincrónica {Nadal et al. 1999}.

La célula  $\alpha$  pancreática es la responsable de secretar glucagón en presencia de bajas concentraciones de glucosa y, al igual que en el caso de la insulina, esa liberación ocurre de forma pulsátil {Jaspan et al. 1986}. En las células  $\alpha$  la glucosa bloquea la secreción de glucagón a través de un proceso que depende del metabolismo del azúcar {Ostenson 1980; Dunbar & Walsh 1982; Opara et al. 1988}. Sin embargo otros compuestos activan la secreción de glucagón, tales como GIP {Ding et al. 1997}, L-arginina {Johansson et al. 1987}, carbacol {Berts et al. 1997} y la estimulación colinérgica {Brunnicardi et al. 1990} y adrenérgica {Oliver et al. 1976; Filipponi et al. 1986}.

Las células  $\alpha$  presentan actividad eléctrica y potenciales de acción de sodio y calcio en ausencia de glucosa {Wesslen et al. 1987; Rorsman & Hellman 1988}, lo que produce un patrón oscilatorio del calcio intracelular. Estas oscilaciones se producen tanto en las células en cultivo {Berts et al. 1995} como dentro del islote de Langerhans y son inhibidas al aumentar la concentración de glucosa {Berts et al. 1996; Nadal et al. 1999}.

En células  $\alpha$  de rata seleccionadas por fluorescencia (FACS) se ha detectado una corriente de potasio dependiente de ATP que es inhibida por tolbutamida, activada por diazóxido, pero que sin embargo es poco modulada por glucosa. Estos resultados son confirmados con hibridación *in situ*, en donde se ha detectado la expresión de las subunidades del  $K_{ATP}$  presente en la célula  $\beta$  pancreática {Bokvist et al. 1999}. Sin embargo, el marcaje con una sulfonilurea fluorescente que reconoce el  $K_{ATP}$ , muestra que las células  $\alpha$  de ratón poseen menor densidad de este canal en su membrana plasmática que las células  $\beta$  {Quesada et al. 1999}.

El modelo iónico presentado por Göpel et al. para la regulación de la secreción de glucagón en ratón incluye el  $K_{ATP}$ , los canales de calcio de tipo L y T, canales de sodio y la corriente A de potasio. En ausencia de glucosa, el modelo establece una ventana de potencial de membrana, entre  $-60\text{mV}$  y  $-20\text{mV}$ , en la que se producirían potenciales de acción, oscilaciones de calcio intracelular y por tanto se liberaría glucagón. El metabolismo

de la glucosa provocaría el cierre del  $K_{ATP}$ , lo que despolarizaría la membrana plasmática por encima de esa ventana de potencial y los canales responsables de los potenciales de acción estarían inactivos. En consecuencia, estos no se producirían y tampoco el aumento de la concentración de calcio intracelular, ni la secreción de glucagón {Gopel et al. 2000}.

Sin embargo, la tolbutamida, un inhibidor del  $K_{ATP}$ , no afecta las oscilaciones de calcio intracelular de las células  $\alpha$  de ratón {Berts et al. 1996; Quesada et al. 1999}, lo que es difícilmente explicable con el modelo anterior. De modo que son necesarios más estudios para establecer la naturaleza de la corriente de potasio dependiente de ATP presente en la célula  $\alpha$  y su participación en el mecanismo de acoplamiento estímulo-secreción del glucagón.

Las vías de señalización intracelular por las que los distintos compuestos modulan la secreción de glucagón es conocida en algunos casos. El GIP estimula la liberación de la hormona a través de AMPc {Ding et al. 1997} y la somatostatina inhibe la actividad eléctrica de las células  $\alpha$  y la secreción de glucagón por medio de una proteína G {Gromada et al. 2001}. Esta misma vía es utilizada por ANP (péptido natriurético atrial) para inhibir el aumento del calcio intracelular en células  $\alpha$  y con los mismos efectos negativos sobre la secreción. A diferencia de lo que ocurre en la célula  $\beta$ , el papel del 8Br-GMPc en el proceso de secreción de la célula  $\alpha$  es inhibitorio {Verspohl & Bernemann 1996}.

Las células  $\alpha$  dentro del islote de Langerhans no están acopladas entre sí ni tampoco con otros tipos celulares. Esta falta de acoplamiento se ha visto en términos electrofisiológicos {Gopel et al. 1999} y de calcio intracelular {Nadal et al. 1999}. Sin embargo, Meda et al. mostraron en 1982 el intercambio de un compuesto fluorescente entre células  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  cultivadas en monocapa {Meda et al. 1982}.

El estudio del proceso de acoplamiento estímulo-secreción en la célula  $\alpha$  ha sufrido un importante empuje en los últimos años. Nadal, Quesada y Soria (1999) emplearon microscopía confocal para registrar las variaciones en la concentración de calcio intracelular en una sección óptica del islote de Langerhans. Tomando la señal de células individuales dentro del islote pudieron clasificar las células dependiendo del rango de concentración de glucosa en el que presentaban oscilaciones de calcio. De esta forma se

obtuvieron varias poblaciones celulares que con técnicas de inmunocitoquímica identificaron cada una con un tipo celular del islote de Langerhans  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  {Nadal et al. 1999; Quesada et al. 1999}. Por otro lado, Gopel et al. en el mismo año pusieron a punto la aplicación de la técnica de *patch-clamp* a células localizadas dentro del propio islote {Gopel et al. 1999}. Hasta el momento, los trabajos realizados habían estudiado las células  $\alpha$  en cultivo, mientras que las nuevas técnicas desarrolladas permiten conocer el comportamiento de la célula  $\alpha$  dentro de su contexto fisiológico como es el islote de Langerhans.

### **III.- ESTRADIOL Y PÁNCREAS**

Uno de los primeros trabajos en los que se estudió el efecto de los estrógenos sobre la fisiología del páncreas data de 1976. Ya en ese año, experimentos de perfusión *in situ*, mostraron que 0.05µg/ml (183nM) de estradiol produce un aumento en las dos fases en las que se divide la secreción de insulina inducida por 8mM glucosa, tanto en ratas hembra normales {SutterDub 1976} como en castradas {Sutter-Dub 1979}. El tratamiento de ratas hembras castradas durante varios días con estradiol produce un aumento de la secreción de insulina de sus islotes en presencia de alta glucosa, sin variación en la secreción basal de insulina {Faure & Sutter-Dub 1979}, efecto que se reproduce cuando se realiza perfusión *in situ* {Sutter-Dub 1979}. Tras ese tipo de tratamiento prolongado, los niveles plasmáticos de insulina se ven aumentados ya desde el tercer día {Sutter-Dub et al. 1978; Faure et al. 1987}, aumento que también se da en ratas normales {Faure et al. 1983}. Sin embargo, 16h después del tratamiento con estradiol se produce una disminución de la secreción de insulina inducida por glucosa medida en islotes {Haouari et al. 1986}, aunque no sucede así cuando son los islotes los que se mantienen en cultivo en presencia de estradiol, puesto que en estos la secreción de insulina aumenta {Sorenson et al. 1993}. Con la utilización de microscopía electrónica, se ha podido observar que al cabo de varios días de tratamiento con estradiol de ratas hembras ovariectomizadas, se produce un cambio en el número de gránulos de varios tipos en las células  $\beta$ , que parece indicar un aumento de su capacidad secretora inmediata por el estrógeno {Aerts et al. 1980}.

Por otro lado, el estradiol impide el desarrollo de diabetes en modelos de pancreatectomía y en animales que han sufrido tratamientos que los predisponen a padecer diabetes {Watanabe 1990; Efrat 1991}. Además, el estrógeno aumenta la insulina en plasma en aquellos animales que además de pancreatectomía han sufrido ovariectomía {Zhu et al. 1998}. El tratamiento con estradiol de mujeres postmenopáusicas con NIDDM muestra que el estrógeno mejora, entre otras cosas, la sensibilidad a la insulina {Brussaard et al. 1997} y aumenta los niveles sanguíneos de glucosa {Andersson et al. 1997}. También en mujeres normales, el estradiol mejora la resistencia a insulina y aumenta la secreción de insulina {Stevenson et al. 1994}.

También en nuestro laboratorio se ha estudiado el efecto insulínico del 17 $\beta$ -estradiol en los islotes de Langerhans pancreáticos. Concentraciones fisiológicas de esta hormona, 100pM-10nM, modifican aquellos eventos dentro de la célula  $\beta$  pancreática que

conducen a un aumento de la secreción de insulina del 30% en presencia de 8.3mM glucosa. El estradiol por sí mismo cierra el  $K_{ATP}$ , y en sinergismo con glucosa, aumenta la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  y la frecuencia de las oscilaciones de calcio intracelular. Sin embargo, con concentraciones no estimuladoras de glucosa, el estradiol no tiene ningún efecto sobre el calcio intracelular. El aumento de la frecuencia de las oscilaciones de calcio es dependiente de la dosis de estrógeno, no se bloquea al inhibir la síntesis de ARN y proteínas y es específico, puesto que otros esteroides, testosterona y estriol no tienen efecto cuando se utilizan a la misma concentración. Estos efectos están mediados por la interacción con un receptor en la membrana plasmática, que se ha podido visualizar con la utilización de estradiol-peroxidasa {Nadal et al. 1998}.

Estos resultados confirman los previamente publicados en rata, en donde concentraciones de 1 a 50nM estradiol aumentan la secreción de insulina en presencia de niveles estimuladores de glucosa. Sin embargo, la disminuye a concentraciones superiores a 100nM {Faure & Sutter-Dub 1979; Etchegoyen et al. 1998}.

Pero el estradiol no sólo afecta a la funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas, sino también la de las  $\alpha$ . Esto se ha puesto de manifiesto al tratar con estradiol ratas hembras durante 14 días y ver que se reestablecen los niveles de glucagón en plasma que se habían visto aumentados por la ovariectomización de los animales {Faure et al. 1983}. Además, en tan sólo unas horas (4-8h), el estradiol administrado *in vivo* ya disminuye la secreción de glucagón estimulada por arginina {Faure et al. 1988}.

## **OBJETIVOS**

Como se ha comentado al final de la Introducción, previamente a la realización de esta tesis, en nuestro laboratorio se había descrito el efecto insulínico del  $17\beta$ -estradiol en el islote de Langerhans pancreático de ratón. Se vio que el estradiol, a concentraciones fisiológicas, potencia en un 30% la secreción de insulina producida por 8mM glucosa. En ese trabajo se fueron estudiando los distintos eventos implicados en el acoplamiento estímulo-secreción en la célula  $\beta$ : actividad del canal de potasio dependiente de ATP ( $K_{ATP}$ ), actividad eléctrica de la membrana plasmática y concentración de calcio intracelular. En todos los casos, se vio que el estradiol producía el efecto que conducía a un aumento de la secreción de insulina: cierre del  $K_{ATP}$ , aumento de la actividad eléctrica y de la concentración de calcio intracelular. Además, este efecto del estrógeno era rápido y estaba mediado por un mecanismo no genómico, puesto que no se vio bloqueado por la utilización de inhibidores de la síntesis de proteínas y de ARN. Utilizando estradiol unido a peroxidasa, se demostró un lugar de unión para estradiol en la membrana plasmática de las células  $\beta$ , que podría estar mediando esos efectos rápidos del estradiol {Nadal et al. 1998}.

De modo que esta tesis doctoral es concebida como la continuación de dicho trabajo, en la que se procede a una mayor caracterización del efecto del estradiol en el islote de Langerhans de ratón, a través de los siguientes objetivos:

I.- Identificación del mecanismo de señalización intracelular implicado en el efecto del  $17\beta$ -estradiol en la célula  $\beta$  pancreática. Estudio del posible papel de dos de los segundos mensajeros más utilizados por el estradiol para ejercer efectos rápidos en otros sistemas celulares: AMPc y GMPc.

II.- Estudio del efecto de concentraciones fisiológicas del  $17\beta$ -estradiol en la célula  $\alpha$  pancreática. Puesto que la secreción de glucagón viene controlada por un patrón oscilatorio del calcio intracelular, es en éste aspecto de la fisiología de la célula  $\alpha$  en donde se estudiará el efecto del estradiol.

III.- Caracterización del receptor de estrógenos presente en la membrana plasmática de las células  $\alpha$  y  $\beta$  pancreáticas. Así mismo, se estudiará si estos receptores son los responsables de los efectos del estradiol en ambos tipos celulares.

# **RESULTADOS**



# I. LOS EFECTOS NO GENÓMICOS DEL 17BETA-ESTRADIOL EN LAS CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS DE RATÓN ESTÁN MÉDIADOS POR LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE GMPc

## ANEXO I

[“Non-genomic actions of 17beta-oestradiol in mouse pancreatic beta-cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase”. A.B. Roper, E. Fuentes, J.M. Rovira, C. Ripoll, B. Soria and A. Nadal. *J Physiol.* 1999 Dec 1; 521 Pt 2: 397-407.]

En un trabajo anterior realizado en el laboratorio se había demostrado el efecto insulinoatrópico del 17 $\beta$ -estradiol en el islote de Langerhans y que ese efecto estaba mediado por un receptor en la membrana plasmática de las células  $\beta$  {Nadal et al. 1998}.

El primer objetivo de esta tesis fue realizar una caracterización completa de la respuesta de los islotes de Langerhans a 17 $\beta$ -estradiol en términos de la concentración de calcio intracelular. Para ello se utilizó una sonda fluorescente sensible a calcio, Indo-1, con la que se cargaron los islotes de Langerhans y se registró la señal de fluorescencia de todo el islote. Una vez establecida la respuesta de calcio a 8mM glucosa, 1nM 17 $\beta$ -estradiol tuvo un efecto rápido en el 83% de los islotes, con un aumento general del nivel basal de calcio. Se obtuvieron cuatro tipos de respuesta (Fig. 1): se generaron oscilaciones de calcio intracelular con estradiol en aquellos islotes que no las presentaban con glucosa (19%, Fig. 1A); los que sí oscilaban vieron aumentada su frecuencia en un 32% de los casos (Fig. 1B) o aumentada la duración de las mismas (Fig. 1C), el 17%; en un 15% de los islotes se obtuvo un patrón irregular de calcio intracelular. El aumento de la frecuencia de las oscilaciones en los dos primeros grupos fue del 89% (Figura 4A) y del 64% en el tiempo de duración en aquellos islotes con este tipo de respuesta a estradiol (Figura 4B). El efecto del estradiol no fue reversible durante el experimento.

A continuación se utilizaron análogos de dos de los segundos mensajeros más utilizados por estradiol en otros sistemas celulares, GMPc y AMPc. En ambos casos, 10 $\mu$ M de los derivados permeables de ambos nucleótidos cíclicos, 8Br-GMPc (Figura 2) y

8Br-AMPC (Figura 3), reprodujeron los resultados obtenidos con estradiol en calcio con una estadística muy similar (Figura 4). Aunque no mostrados en las figuras, resultados similares se obtuvieron con 1 $\mu$ M forskolina (FK). Estos resultados abrieron la posibilidad de que fuera tanto GMPc como AMPc los responsables del efecto del estradiol.

La medida de los niveles de AMPc y GMPc en islotes de Langerhans por radioinmunoanálisis (RIA) mostró un aumento del GMPc en presencia de 10nM estradiol (Fig. 5B). No hubo cambio en los niveles de AMPc tras 5 ó 15min con estradiol, ni tampoco por un aumento de la glucosa (Fig. 5A). El aumento del GMPc por estradiol fue del 37 $\pm$ 15% en presencia de 8mM glucosa, nivel muy similar al producido por 11mM glucosa.

A continuación se midió la actividad del  $K_{ATP}$  en respuesta a 8Br-GMPc utilizando la técnica de *patch-clamp*, en la configuración de célula entera (cell-attached). Holz y colaboradores ya habían demostrado que el  $K_{ATP}$  era cerrado por análogos de AMPc {Holz et al. 1993}. Al igual que se había visto para 100pM estradiol (Nadal et al. 1998, Fig. 6A y C), en ausencia de glucosa, 10 $\mu$ M 8Br-GMPc cerró el  $K_{ATP}$  de forma rápida (Fig. 6B y C). La disminución de la probabilidad de apertura del canal fue de un 65% con respecto al control (Fig. 6D). Se descartó la modulación del canal por una interacción directa cuando se demostró que 8Br-GMPc no tenía efecto en parche aislado (inside-out) (Fig. 7).

Puesto que el GMPc puede verse aumentado por dos guanilato ciclasas, una soluble y otra de membrana, se utilizó un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, LY 83583, para ver cuál de las dos estaba implicada. Se descartó la soluble puesto que LY no impedía el efecto inhibitorio del estradiol sobre el  $K_{ATP}$  (Fig. 6D).

Para evaluar la participación de la proteína quinasa dependiente de GMPc, PKG, en el efecto del estradiol, se utilizó un inhibidor competitivo de esta enzima, Rp-8-pCPT-cGMPS. Éste impidió el efecto bloqueante del estradiol en el  $K_{ATP}$ , mientras que un inhibidor de PKA fue ineficaz (Fig. 8).

Todos estos resultados nos permiten concluir que el efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la célula  $\beta$  pancreática está mediado por la vía de señalización del GMPc y PKG.

## **II. EFECTOS NO GENÓMICOS DE LOS ESTRÓGENOS A TRAVÉS DE LA UNIÓN CON UN RECEPTOR EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA NO RELACIONADO CON ER $\alpha$ NI ER $\beta$**

### **ANEXO II**

[“Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$ ”. A. Nadal, A.B. Roper, O. Laribi, M. Maillet, E. Fuentes and B. Soria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Oct 10; 97(21):11603-8.]

Una vez que se supo el segundo mensajero implicado en la vía de señalización intracelular utilizada por 17 $\beta$ -estradiol en la célula  $\beta$  pancreática, se procedió a estudiar el receptor de estrógenos presente en la membrana plasmática responsable de esos efectos.

Para comprobar la funcionalidad del sitio de unión de estradiol en la membrana plasmática que se había visto anteriormente {Nadal et al. 1998}, se utilizó estradiol unido a peroxidasa (E-HRP) en experimentos de calcio intracelular. Por su gran tamaño, este compuesto no puede atravesar la membrana plasmática, por lo que se tiene certeza de que actúa a través de la membrana. E-HRP reprodujo el efecto del 17 $\beta$ -estradiol en células  $\beta$  dentro del islote, con un aumento de la frecuencia de las oscilaciones de calcio debidas a 8mM glucosa dependiente de la dosis y en el mismo rango de concentraciones que el estradiol (Fig. 1A y C).

En ensayos realizados paralelamente por Ouahiba Laribi, no se vio marcaje en la membrana plasmática de células pancreáticas con ninguno de los anticuerpos dirigidos contra diferentes dominios de los receptores de estrógenos intracelulares, RE $\alpha$  y RE $\beta$  (Fig. 4). Una vez descartada la participación de alguno de ellos, se procedió a identificar el receptor responsable de los efectos del estradiol y su perfil farmacológico.

El E-HRP ya había sido utilizado para marcar el sitio de unión de estradiol en la membrana plasmática de células pancreáticas en cultivo, fijadas pero no permeabilizadas. El marcaje se puede visualizar utilizando diaminobencidina (DAB) y urea, que reaccionan con la peroxidasa y forman un precipitado oscuro que absorbe la luz incidente sobre la

muestra (Fig. 2A). Este precipitado aparece negro o marrón dependiendo de si el DAB lleva o no metal para aumentar la sensibilidad del marcaje. Cuando se utiliza estradiol como competidor, o cualquier otro compuesto que se une al mismo sitio en la membrana, las células presentan menor precipitado y por tanto absorben menos la luz (Fig. 2B). La luz absorbida se obtiene restando la intensidad de luz que atraviesa el fondo del cubre y la media que atraviesa la célula a lo largo de una línea que la cruza (Fig. 2C). El programa que dirige el microscopio confocal permite medir esa intensidad de luz y los resultados se presentan en términos de porcentaje de luz absorbida con respecto al control. Los parámetros del microscopio se mantienen de forma que la intensidad de luz que atraviesa el fondo del cubre sea constante a lo largo de los experimentos. Este tipo de medida se realiza en células individuales cultivadas, fijadas pero no permeabilizadas. En la Figura 5 del Anexo 2 y en las 6 y 7 del Anexo 3, el marcaje con peroxidasa ha sido restando de todos los resultados.

Con esta metodología se vio que la competición con estradiol era dependiente de la dosis (Fig. 2D). Además dopamina (Dpn), noradrenalina (NE) y adrenalina (Epr) también se unían al mismo sitio, al igual que 2OH-estradiol (2-OHE) (Fig. 5A). Para descartar ninguno de los receptores clásicos por los que actúan estas catecolaminas, se utilizaron ligandos de los receptores  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$  adrenérgicos, D1 dopaminérgicos, imidazolinas y sigma. Ninguno de ellos compitió por el sitio de unión del estradiol (Fig. 5B y C).

Para ver la funcionalidad de ese receptor de estrógenos de membrana, se realizó medida de calcio intracelular con noradrenalina y estradiol. En presencia de glucosa y 100nM noradrenalina, 100nM estradiol ya no tuvo ningún efecto sobre el calcio (Fig. 5D), probablemente por saturación de sus sitios de unión. Sin embargo, la noradrenalina siguió haciendo efecto en el caso inverso (Fig. 5E), de acuerdo con un efecto sobre la célula  $\beta$  a través de receptores adrenérgicos, lo que descartó además un papel de estos en el efecto del estradiol. De forma similar sucedió con la dopamina (resultado no mostrado).

Con todos estos resultados, podemos decir que el receptor de estrógenos de membrana responsable del efecto del estradiol en las células  $\beta$  pancreáticas no es ninguno de los receptores intracelulares clásicos, sino que se trata de un receptor que además interacciona con otras catecolaminas y con catecolestrógenos.

### **III. UN RECEPTOR DE ESTRÓGENOS DE MEMBRANA NO CLÁSICO PRODUCE EFECTOS RÁPIDOS OPUESTOS EN EL PÁNCREAS ENDOCRINO**

#### **ANEXO III**

[“A nonclassical estrogen membrane receptor triggers rapid differential actions in the endocrine pancreas”. A.B. Roper, B. Soria, A. Nadal. Enviado a publicación.]

Un vez estudiado el receptor y la vía de señalización implicados en el efecto del  $17\beta$ -estradiol sobre la célula  $\beta$  pancreática, nos preguntamos si en otros tipos celulares del islote de Langerhans los estrógenos también tenían efecto. De modo que se procedió a estudiar la célula  $\alpha$ , secretora de glucagón.

En esta ocasión, para la medida de la concentración de calcio intracelular se utilizó la sonda fluorescente sensible a calcio Fluo-3 y un microscopio confocal. Con este tipo de microscopía, se registra la señal de fluorescencia tan sólo de una sección óptica del islote y el programa informático que controla el sistema permite un posterior análisis, en el que se pueden tomar las variaciones en la fluorescencia de células individuales dentro del islote. Esto permite estudiar la respuesta de los distintos tipos celulares del islote cuando se encuentran en su entorno fisiológico. En la Figura 1A se muestra la imagen de un islote de Langerhans cargado con Fluo-3 tomada con un microscopio confocal, al que se le ha aplicado una escala de pseudocolor en el que el azul representa el menor nivel de calcio y el rojo el máximo. Debido a la baja difusibilidad de la sonda, sólo son accesibles a ella las células situadas en la periferia del islote.

Las células  $\alpha$  y  $\beta$  dentro del islote se identificaron por su patrón oscilatorio de calcio intracelular a baja y alta concentración de glucosa respectivamente {Nadal et al. 1999}. En la Figura 1B se tiene el patrón oscilatorio de calcio que presenta una célula  $\beta$  dentro del islote en presencia de 8mM glucosa y el aumento de la frecuencia de las oscilaciones con 1nM de  $17\beta$ -estradiol. De la misma forma, se midieron los movimientos de calcio intracelular en células  $\alpha$  dentro del islote, identificadas por su patrón oscilatorio en respuesta a 0.5mM glucosa (Fig. 1A). Esas oscilaciones se vieron inhibidas en un 51% de las células  $\alpha$  por 1nM  $17\beta$ -estradiol, con parada de las oscilaciones al cabo de  $10.1 \pm 0.9$

min (Fig. 1C). El 29% de las células sufrieron una disminución de la frecuencia oscilatoria en un  $38\pm 4$  % (tomado como disminución de la frecuencia aquel cambio superior a  $-10\%$ ) y en el 20% restante no hubo efecto incluso tras 25 min con estradiol. Similares resultados se obtuvieron con 1nM E-HRP (Fig. 1D): en el 49% de las células  $\alpha$  se inhibieron las oscilaciones al cabo de  $10.5\pm 1.0$  min; en el 30% disminuyó la frecuencia un  $28\pm 5$  %, mientras que en el 21% restante el E-HRP no tuvo efecto.

Por lo tanto, el  $17\beta$ -estradiol, a concentraciones fisiológicas, también modifica el patrón de calcio intracelular de las células  $\alpha$  del islote. Además lo hace a través de la interacción con un receptor en la membrana plasmática.

Para estudiar la implicación de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  en el efecto del estradiol en las células  $\alpha$  y  $\beta$  se utilizó el antiestrógeno ICI 182,780. En ninguno de los dos tipos celulares  $1\mu\text{M}$  ICI bloqueó el efecto del estradiol (Fig. 2).

A continuación se hicieron ensayos de unión de E-HRP a la membrana plasmática, con DAB-Co para visualizar esa unión. Las células  $\alpha$  en cultivo fueron identificadas posteriormente por su marcaje intracelular con anticuerpos anti-glucagón (Fig. 3). En este caso, la medida de la luz absorbida por el precipitado se realizó tomando la media de la absorbida por toda la célula. Se vio que la competición con estradiol era dependiente de la dosis, siguiendo una curva muy similar a la de las células  $\beta$  (Fig. 4).

De la misma forma que se había hecho en la medida de calcio intracelular, también se realizó el ensayo de competición con ICI 182,780 para ver si se unía al mismo sitio que el estradiol en la membrana plasmática. Ninguno de los dos antiestrógenos empleados, ICI y tamoxifen (T) compitieron (Fig. 5), lo que confirmó los resultados obtenidos en calcio y descartó un papel de los receptores de estrógenos intracelulares.

A continuación se hicieron ensayos de competición con las catecolaminas dopamina (Dop), noradrenalina (NE) y adrenalina (E) y se vio que se unían al mismo sitio que el estradiol (Fig. 6A). Sin embargo, no sucedió así con ligandos para los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos, clonidina (Clo) y propranolol (Prop), y dopaminérgicos, quinpirole (Quin) (Fig. 6B).

Los resultados presentados en este anexo III demuestran que dentro del islote de Langerhans de ratón, el estradiol tiene distintos efectos en las células  $\alpha$  y  $\beta$ , actuando sobre el mismo receptor de estrógenos de membrana que no es ninguno de los intracelulares clásicos y que además es compartido por catecolaminas y catecolestrógenos.

## **DISCUSIÓN**

## EL ISLOTE DE LANGERHANS Y EL 17 $\beta$ -ESTRADIOL

El efecto del 17 $\beta$ -estradiol en la fisiología del islote de Langerhans no es nuevo, sino que ya trabajos fechados durante la década de los setenta y la de los ochenta, realizados con ratas, demostraron un efecto insulínico del estradiol tanto *in vivo* como *in situ* {SutterDub 1976; Sutter-Dub et al. 1978; Faure & Sutter-Dub 1979; Sutter-Dub 1979; Faure et al. 1983; Faure et al. 1987}. Más adelante se fue corroborando el papel del estradiol en la prevención o mejora de la diabetes, ya fuera en modelos animales {Watanabe 1990; Efrat 1991} o en mujeres postmenopáusicas {Stevenson et al. 1994; Brussaard et al. 1997; Andersson et al. 1997}. De la misma forma, también se vio que el estradiol disminuía los niveles de glucagón *in vivo* {Faure et al. 1983; Faure et al. 1988}.

Lo que sí ha permanecido desconocido hasta el momento ha sido el mecanismo por el cual el estradiol lleva a cabo esos efectos en las células  $\alpha$  y  $\beta$  pancreáticas, encargadas de la secreción de glucagón e insulina respectivamente. En un trabajo de Nadal et al. de 1998, se demostró que concentraciones fisiológicas de 17 $\beta$ -estradiol producían un aumento rápido de la secreción de insulina de islotes de ratón, de un 30% con respecto a la liberada por 8mM glucosa. Ese efecto estaba mediado por la interacción del estrógeno con un receptor en la membrana plasmática de las células  $\beta$  pancreáticas {Nadal et al. 1998}. En esta tesis se presentan evidencias de que ese mismo receptor es el implicado en la inhibición de las oscilaciones de calcio intracelular por estradiol en la célula  $\alpha$  pancreática, con lo que se espera que disminuya la secreción de glucagón, puesto que ésta depende del calcio intracelular {Leclercq-Meyer et al. 1979}.

La obvia contradicción que surge a partir del efecto del estradiol en dos tipos celulares del mismo tejido, aumento de calcio intracelular en células  $\beta$  y disminución en células  $\alpha$ , no es tal si tenemos en cuenta el papel que la insulina y el glucagón juegan en la homeostasis de glucosa en sangre. El aumento de la secreción de insulina y la disminución de la de glucagón están ambas dirigidas a disminuir la concentración de glucosa plasmática. De modo que el estradiol estaría utilizando dos vías aparentemente opuestas, en dos tipos celulares, para llevar a cabo un mismo efecto fisiológico.

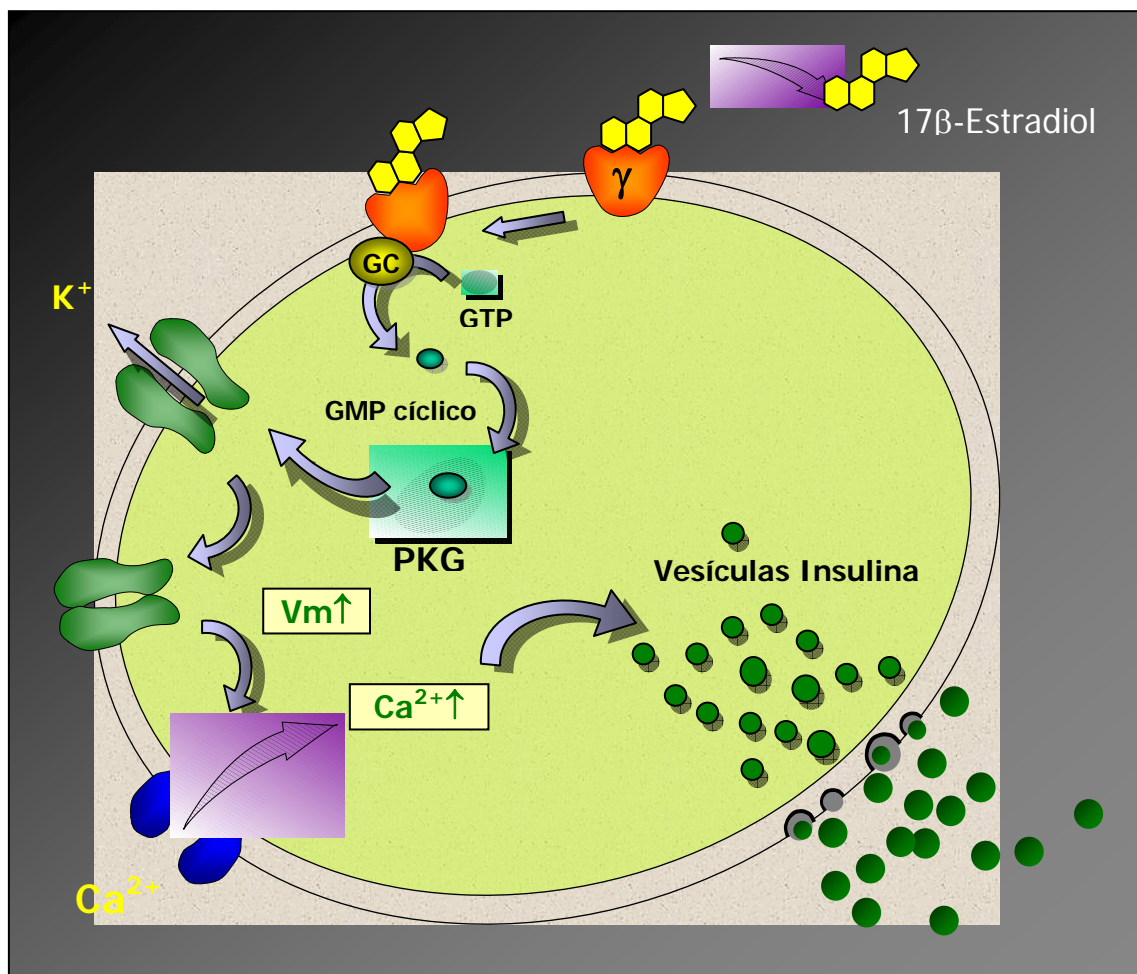


## VÍA DE SEÑALIZACIÓN UTILIZADA POR EL ESTRADIOL EN EL ISLOTE DE LANGERHANS

La interacción del estradiol con su receptor en la membrana plasmática de la célula  $\beta$  pancreática produce un aumento en la concentración de GMPc. Éste activa la PKG que a través de una fosforilación cierra el  $K_{ATP}$  y despolariza la membrana plasmática. Los canales de calcio dependientes de voltaje de la membrana se abren y dan lugar a un patrón oscilatorio del calcio intracelular. El resultado fisiológico es el aumento de la secreción de insulina inducida por glucosa. En Figura 1 se presenta el modelo de la acción del  $17\beta$ -estradiol en la célula  $\beta$  pancreática de ratón.

La vía GMPc-PKG está implicada en la secreción de insulina por glucosa {Laychock et al. 1991; Green et al. 1993} aunque no se sabe de qué forma interviene en el proceso. Al ser utilizada también por el estradiol, éste potencia así una de las vías por las que la glucosa actúa como secretagogo insulínico en el islote de Langerhans. Se demuestra aquí por primera vez una modulación negativa del  $K_{ATP}$  por PKG mediada por estradiol. Se desconoce si la diana de la PKG es el propio canal o si el efecto es indirecto por medio de otras proteínas. Éste podría ser también el mecanismo por el cual el GMPc producido por la glucosa regula la secreción de insulina. Por lo tanto, son necesarios más experimentos que establezcan si la PKG fosforila el  $K_{ATP}$  o en su caso, qué proteína es la diana de la quinasa. Además queda por confirmar la participación de PKG en el cierre del canal por glucosa.

Las enzimas encargadas de sintetizar GMPc a partir de GTP son las guanilato ciclasas que existen en dos formas, solubles en el citosol o insertadas en la membrana plasmática. Las primeras son activadas por NO y CO y las segundas por péptido natriuréticos, ANP, BNP y CNP {Garbers & Lowe 1994; Carvajal et al. 2000}. En mamíferos también hay dos tipos de PKG en función de su localización. La PKG I es soluble y tiene dos isoformas procedentes de procesamiento alternativo de un mismo ARNm y la PKG II está asociada a la cara intracelular de la membrana plasmática por miristoilación {Lohmann et al. 1997}.



**FIGURA 1. Modelo del efecto rápido del 17β-estradiol en la célula β del islote de Langerhans pancreático de ratón**

En la figura se resume el mecanismo por el cual el 17β-estradiol modifica la secreción de insulina en la célula β pancreática. Se incluye el GMPc como segundo mensajero que modifica el canal de potasio dependiente de ATP, el potencial de membrana, el calcio intracelular y por tanto la secreción de insulina. *Figura cedida por el Dr. Mario Díaz.*

En el islote de Langerhans se tiene presencia de ambos tipos de GC, puesto que un inhibidor de la GCs bloquea el aumento de GMPc por glucosa {Laychock et al. 1991} y el ANP (GCm) potencia los movimientos de calcio intracelular en islotes {Lee & Laychock 1997}. La utilización de un inhibidor de la GCs no bloquea el efecto del estradiol sobre el  $K_{ATP}$  en células β y compuestos dadores de NO, activador de la GCs, abren el  $K_{ATP}$  {Tsuura et al. 1994} y disminuyen la secreción de insulina {Cunningham et al. 1994}.

Además, el NO es el mecanismo por el que la interleuquina  $1\beta$ , liberada por los macrófagos, produce muerte de las células  $\beta$  pancreáticas, causa de la diabetes mellitus tipo I {Spinas 1999}. De modo que, aunque podría darse un modo dual de acción del NO dependiendo del tiempo de exposición a él, éste no parece estar implicado en el efecto del estradiol en la célula  $\beta$  pancreática.

Por otra parte se ha visto activación de la GCm por estradiol en células PC12 y la interacción directa del estradiol con una GCm consistente en los dominios intracelulares catalítico y quinasa {Chen et al. 1998}. La interacción del estradiol con esos dominios no puede estar mediando el efecto del estrógeno sobre la célula  $\beta$  pancreática, puesto que E-HRP lo mimetiza sin poder atravesar la membrana plasmática. Por lo tanto, son necesarios más experimentos en el islote de Langerhans para establecer cuál de las dos GC es la implicada en el efecto del estradiol en la célula  $\beta$ . De la misma forma con la PKG, si se trata de la soluble o la de membrana la isoforma activada por el aumento de GMPc por estradiol. Tampoco hay que descartar la participación de las fosfodiesterasas específicas en el aumento de los niveles de GMPc en el islote de Langerhans.

En cuanto a la vía de señalización del AMPc y la PKA utilizada por estradiol en otros tipos celulares {Falkenstein et al. 2000}, no participa en el caso de la célula  $\beta$  pancreática, puesto que no se tiene aumento de la concentración de AMPc en respuesta al estrógeno y además, un inhibidor de la PKA no impide su efecto sobre el  $K_{ATP}$ . Al contrario de lo que sucede con el canal de potasio de alta conductancia, Maxi-K {Valverde et al. 1999}, en la célula  $\beta$  no hay interacción directa del estradiol con el  $K_{ATP}$ , puesto que no tiene efecto cuando se mide la actividad del canal con la técnica de *patch-clamp* en la configuración de parche aislado.

Si bien el mecanismo de secreción de glucagón en la célula  $\alpha$  apenas es conocido, sí se sabe que está mediado por movimientos de calcio intracelular {Johansson et al. 1987}. Por un lado, la presencia del  $K_{ATP}$  y su papel en el acoplamiento estímulo-secreción en la célula  $\alpha$  es un tema muy controvertido {Nadal et al. 1999; Gopel et al. 2000}. Por otra parte, el GMPc disminuye la secreción de glucagón y el calcio intracelular {Verspohl & Bernemann 1996 y Anexo III de esta tesis}, de modo que el estradiol podría utilizar la misma vía de señalización que en la célula  $\beta$ . De esta forma, se tendría que un mismo segundo mensajero, el GMPc, produce dos efectos opuestos en dos tipos celulares de un mismo tejido.

## RECEPTOR DE ESTRÓGENOS DE MEMBRANA NO CLÁSICO

La gran controversia que existe en el campo del receptor de estrógenos de membrana se centra principalmente en dos posibilidades que se plantean con respecto a su naturaleza: que se trate de los mismos receptores intracelulares, localizados en la membrana, o que por el contrario sea un receptor que no guarde ninguna relación estructural con ellos. Ambas hipótesis no son excluyentes, dada la enorme variedad de tipos celulares y de efectos del estradiol. Sin embargo, existen algunas cuestiones a tener en cuenta a la hora de apoyar cada uno de los modelos.

La utilización de antagonistas de los receptores de estrógenos intracelulares es un arma importante para distinguir entre la participación de estos o de otro tipo de receptores en los efectos del estradiol. Actualmente el ICI 182,780 es el antiestrógeno específico de los receptores clásicos que más se utiliza {Wakeling et al. 1991}. A este respecto y tal y como se citaron en la Introducción, hay numerosos ejemplos que muestran tanto un bloqueo como una total ineficacia del ICI 182,780 para inhibir los efectos rápidos del estradiol. En esta tesis se muestra que  $1\mu\text{M}$  de este antiestrógeno no impide el efecto de  $1\text{nM}$   $17\beta$ -estradiol en el calcio intracelular, ni en la célula  $\alpha$ , ni en la  $\beta$ . Además, en ensayos de competición por el sitio de unión del estradiol con ICI, se ve que éste no se une al receptor de estrógenos presente en la membrana plasmática de ninguno de los dos tipos celulares.

Por otro lado, los anticuerpos desarrollados contra los receptores intracelulares permiten visualizar la presencia o no de estos en la membrana plasmática. Además, por reconocer distintos dominios del receptor, también dan información acerca de cuáles de ellos están presentes en el de membrana. Con anticuerpos dirigidos contra diferentes dominios de  $\text{RE}\alpha$ , se ha visto marcaje en la membrana plasmática de una línea celular de pituitaria, GH3/B6, y en hipotálamo {Pappas et al. 1995; Clarke et al. 2000}. Además, el anticuerpo que reconoce el dominio de unión del ligando al  $\text{RE}\alpha$  bloquea la unión de E-BSA a la membrana de células de músculo liso {Morey et al. 1997}. Sin embargo no sucede así con la célula  $\beta$  pancreática, en donde cinco anticuerpos dirigidos contra  $\text{RE}\alpha$  y dos contra  $\text{RE}\beta$  no marcan la membrana plasmática de células no permeabilizadas, mientras que ambos están presentes en el citosol. Ninguno de ellos compite con el receptor de estrógenos de membrana en ensayos de unión con E-HRP.

Por otra parte, se ha visto un 2-3% de expresión de RE $\alpha$  y RE $\beta$  en la membrana plasmática de células CHO transfectadas con el ADNc de ambos receptores. Además estos están acoplados a proteínas G, Gq y Gs, que al unirse estradiol aumentan los niveles de IP<sub>3</sub> y AMPc {Razandi et al. 1999}. Sin embargo este tipo de experimentos no está exento de controversia.

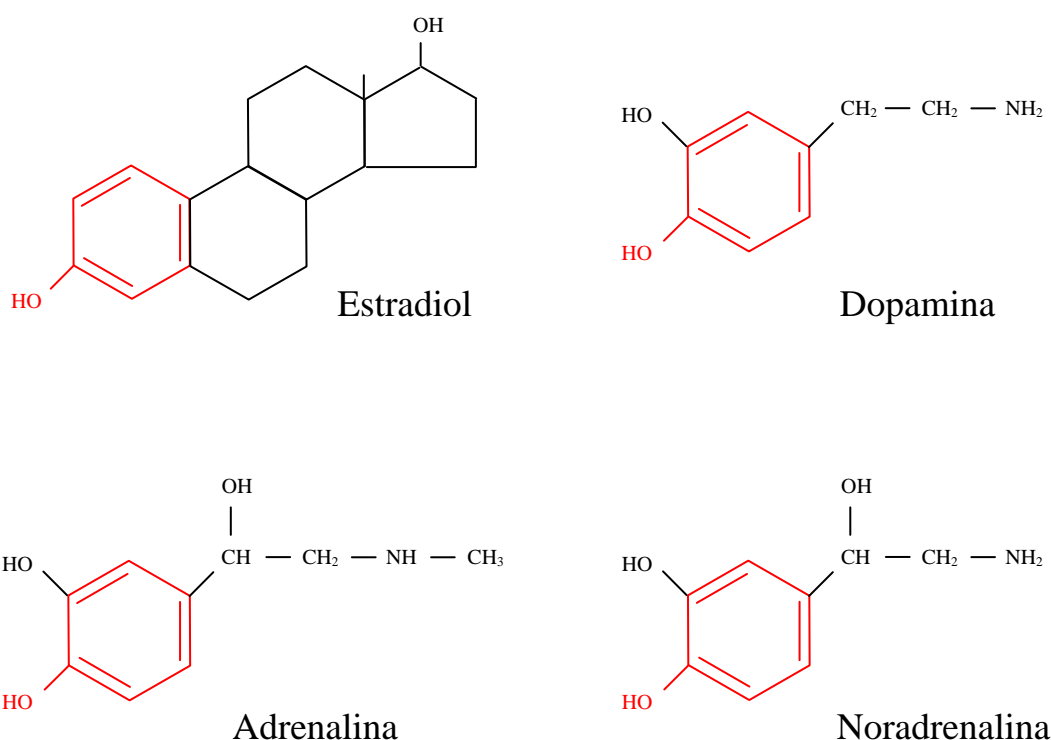
Para que una proteína se localice en la membrana plasmática es necesario que disponga de un dominio transmembrana a través del cual se inserte en ella. Es poco probable que una proteína con tales regiones hidrofóbicas pueda presentarse en forma soluble en un entorno hidrofílico como es el citosol. Por lo tanto, este dominio debe estar presente exclusivamente en la forma de membrana y podría incluirse en la proteína citosólica por procesamiento alternativo. En el caso anterior de expresión de RE $\alpha$  y  $\beta$  en CHO, este procesamiento parece improbable, puesto que la transfección se hace con los ADNc de ambos receptores. Las librerías de ADNc se originan a partir de los ARNm ya procesados de las células, es decir, sólo contienen exones, puesto que los intrones han sido ya eliminados. Por lo tanto, no existe la posibilidad de inserción de exones presentes en la estructura del gen pero eliminados del ARNm para formar la proteína citosólica y que sin embargo se incluyan en la forma de membrana. De modo que la proteína queda sujeta a poder insertarse en la membrana plasmática por modificaciones postraduccionales que la unan a una molécula lipídica. Al examinar la estructura del RE $\alpha$ , los propios autores, Razandi et al., indican que no hay sitios de palmitoilación y sólo unos pocos candidatos de miristoilación {Razandi et al. 1999}. Por otro lado, se ha visto que una subpoblación de RE es glicosilada por N-acetilglucosamina {Jiang & Hart 1997}. Sin embargo todas estas posibilidades se ven anuladas por el hecho de que ambas proteínas, la citosólica y la de membrana, tienen el mismo peso molecular y proceden de un mismo transcrito {Razandi et al. 1999}.

Otros trabajos apoyan la existencia de un tipo de receptor de estrógenos en la membrana plasmática que no está relacionado con los intracelulares clásicos. Éste es el caso del receptor por el que el estradiol modifica las corrientes producidas por kainato en neuronas de hipocampo. Ese efecto del estrógeno sigue presente en ratones carentes (knockout) de RE $\alpha$ . Aquí, la implicación del RE $\beta$  es descartada por la utilización del antiestrógeno ICI 182,780, que no es capaz de bloquear el efecto del estradiol {Gu et al. 1999}. Por otro lado, hay activación de ERK a través de la membrana en células carentes

de ambos receptores de estrógenos,  $\alpha$  y  $\beta$  {Filardo et al. 2000}. En macrófagos que no expresan el RE $\beta$ , IC-21, anticuerpos anti-RE $\alpha$  no marcan la membrana plasmática {Benten et al. 2001}. Toda una batería de anticuerpos anti-RE $\alpha$  y anti-RE $\beta$  tampoco marcan la membrana plasmática de células  $\beta$  pancreáticas {Nadal et al. 2000}.

Si el receptor de membrana que media los efectos del estradiol en estos tipos celulares no es ninguno de los intracelulares, ¿cuál es el responsable entonces? En esta tesis se da respuesta a esta pregunta para dos tipos celulares del islote de Langerhans de ratón: la célula  $\alpha$  y la célula  $\beta$ . Para ello se cuenta con los ensayos de competición con E-HRP por el sitio de unión del estrógeno en la membrana plasmática de células no permeabilizadas. Así se tiene que en ambos casos el receptor es compartido, no sólo por el catecolestrógeno 2OH-estradiol, sino además por tres catecolaminas: dopamina, adrenalina y noradrenalina. La participación de alguno de los receptores clásicos de esas catecolaminas se descarta con la utilización de ligandos de los receptores dopaminérgicos y de los  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - y  $\beta$ -adrenérgicos, que compiten por el receptor de estradiol. Hasta la fecha, sólo existe un receptor que una estas tres catecolaminas: el que ha sido llamado receptor  $\gamma$ -adrenérgico y su existencia se ha puesto de manifiesto en células de músculo liso y neuronas del ganglio ciliar de pollo {Hirst & Neild 1980; Hirst et al. 1982; Benham & Tsien 1988; Yawo 1996; Yawo 1999}. Poco se sabe acerca de él aparte de su interacción con las catecolaminas y la falta de efecto sobre él de los ligandos para los respectivos receptores clásicos de las mismas. Por otra parte, la noradrenalina, actuando sobre ese receptor, activa la PKG a través de un mecanismo independiente de NO {Yawo 1999}. Ésta es la misma vía de señalización que utiliza el estradiol en la célula  $\beta$  pancreática, con unas primeras evidencias de la no implicación del NO.

Por lo tanto, el receptor de estrógenos de membrana no clásico presente en la membrana de las células  $\alpha$  y  $\beta$  pancreáticas de ratón interacciona también con otras catecolaminas y con catecolestrógenos. La estructura de estos compuestos y la del estradiol tienen en común un anillo fenol, tal y como se puede apreciar en rojo en la Figura 2, que también está presente en varios xenoestrógenos que se unen al mismo receptor (Figura 3 Anexo III), por lo que es probable que sea esa estructura a través de la cual esos compuestos interaccionan con el receptor de membrana.



**FIGURA 5. Estructura del Estradiol y las catecolaminas Dopamina, Adrenalina y Noradrenalina**

En la figura se presenta la estructura de cuatro de los compuestos que interaccionan con el receptor de estrógenos de membrana no clásico: estradiol, dopamina, adrenalina y noradrenalina. La característica común en todos ellos es el grupo fenol, mostrado en la figura en color rojo, estructura candidata a ser la responsable de la interacción con el receptor.

Los intentos de aislar el receptor de estrógenos de la membrana plasmática han dado por el momento una banda de 29kDa que se ha detectado en cerebelo {Bukusoglu & Krieger 1994}, espermatozoides humanos {Luconi et al. 1999} y útero {Monje & Boland 1999}. Además se han visto otras bandas en cerebro {Zheng & Ramirez 1997} y útero {Monje & Boland 1999}. En el caso de los espermatozoides se utilizó un anticuerpo dirigido contra el dominio de unión a estradiol del RE $\alpha$ , H222 {Luconi et al. 1999}. Sin embargo, en útero fueron varios anticuerpos dirigidos contra diferentes dominios de RE $\alpha$ . Esto demuestra que aunque esas bandas sean de un peso molecular inferior al de los receptores clásicos, aún conservan las regiones reconocidas por todos esos anticuerpos y además con una estructura similar.

Por otra parte, el receptor de estrógenos de membrana es compartido con progesterona en cerebelo {Bukusoglu & Krieger 1994}. La secuencia completa del ADNc de una proteína de unión a progesterona en membrana se ha obtenido de células de músculo liso vascular porcino {Falkenstein et al. 1996; Falkenstein et al. 1999} y humano {Gerdes et al. 1998}. La proteína porcina que se predice tiene 194 aminoácidos y un peso molecular de 21.67kDa. Falta por saber si esos receptores de progesterona de membrana son compartidos por estradiol.

Además de identificar el receptor de estrógenos que se expresa en la membrana plasmática celular, también han de centrarse esfuerzos en demostrar su funcionalidad mediando los efectos fisiológicos del estradiol. En el caso de la línea celular de pituitaria, GH3/B6, un anticuerpo dirigido contra RE $\alpha$  reproduce la liberación de prolactina por estradiol y la activación de eNOS en endotelio se ve aumentada por sobreexpresión de RE $\alpha$  e inhibida por ICI 182,780 {Chen et al. 1999}. En las neuronas de hipocampo de rata en donde se ha visto marcaje de la membrana con anticuerpos anti-RE $\alpha$  {Clarke et al. 2000}, no se ha comprobado su funcionalidad y en el caso del ratón, no es éste el receptor responsable del efecto del estradiol en hipocampo, puesto que sigue produciéndose en animales carentes (knockout) de ER $\alpha$  {Gu et al. 1999}. Por otro lado, en esta tesis se demuestra que el receptor de estrógenos de membrana descrito en células  $\alpha$  y  $\beta$  del islote de Langerhans es el responsable del efecto del estradiol, puesto que éste es reproducido por la misma concentración de E-HRP. Además, en presencia de noradrenalina, el estradiol no modifica el patrón oscilatorio de calcio de las células  $\beta$ , en coherencia con un bloqueo del receptor por la noradrenalina. A la inversa, en presencia de estradiol, la noradrenalina sigue ejerciendo el mismo efecto, de acuerdo con su papel a través de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos presentes en la célula  $\beta$  pancreática. De forma similar sucede con la dopamina (resultados no mostrados).

Indudablemente, los animales carentes de RE $\alpha$  y de RE $\beta$  (doble knockout) serán una fuente importante de evidencias a favor o en contra de la presencia de estos receptores en la membrana plasmática. Aunque estos ratones ya se han obtenido {Couse et al. 1999; Ogawa et al. 2000}, por el momento no se han publicado resultados de los efectos del estradiol a través de la membrana plasmática.



## **GENÓMICO -- RECEPTOR INTRACELULAR *versus* NO GENÓMICO -- RECEPTOR DE MEMBRANA**

Tras los numerosos estudios que se han venido realizando desde el publicado en 1975 por Pietras & Szego, se ha dado solidez a la existencia de un nuevo mecanismo de acción en el efecto de los estrógenos. Por lo tanto hemos de rendirnos ante la evidencia de que estos no sólo actúan desde dentro en un proceso lento y de larga duración, sino que además son capaces de actuar como las hormonas hidrofílicas, a través de un receptor en la membrana plasmática, que produce efectos rápidos en los que poco o nada tiene que ver la transcripción génica.

Pero en contra de lo que podría pensarse en un principio en cuanto a la clara distinción entre efectos genómicos mediados por receptores intracelulares y los no genómicos, a través de receptores de membrana, se está viendo que dicha distinción es algo caprichosa. Según se ha podido observar, la activación rápida de MAPK por estradiol produce efectos fisiológicos que no se detectan en un corto espacio de tiempo, sino que se requieren varias horas, aunque se produzcan a través de una interacción del estrógeno con un receptor en la membrana plasmática. Entre estos ejemplos figura la estimulación del crecimiento celular {Di Domenico et al. 1996; Morey et al. 1997} y la inhibición de la apoptosis {Razandi et al. 2000a}. Puesto que tanto el crecimiento celular como la apoptosis requieren activación de la transcripción génica y que la vía de las MAPKs puede dar lugar a procesos genómicos {Alberts et al. 1994}, es probable que el estradiol, a través de la activación rápida de una vía de señalización intracelular produzca efectos finales genómicos. De hecho, el E-BSA activa la transcripción de un gen formado por el promotor de c-fos de una forma independiente de los RE intracelulares, en la línea de neuroblastoma SK-N-SH, lo que además indica que esos efectos genómicos a través de señalización intracelular podrían estar mediados por un receptor de estrógenos en la membrana plasmática {Watters et al. 1997}.

Por otra parte, es bien conocido que el AMPc activa la PKA y que una de sus dianas es la proteína de unión a CRE, CREB. Esta proteína interacciona con CRE (cyclic AMP response element), que es una zona del ADN presente en la zona reguladora de algunos genes. Cuando CREB es fosforilada estimula la transcripción génica {Alberts et al. 1994}, por lo que la activación de la vía de señalización del AMPc puede producir efectos no genómicos en minutos y genómicos a largo plazo.

Tampoco hay que descartar el hecho de que los mismos receptores de estrógenos intracelulares pudieran participar en la activación de vías de señalización intracelular con resultados no genómicos, previa o paralelamente a su papel transcripcional.

Por lo tanto, los términos RE intracelulares, RE de membrana, genómico, no genómico, a largo plazo y rápido, se pueden entrecruzar de diversas formas en cada tipo celular con el fin de producir la amplia variedad de efectos fisiológicos de los estrógenos. Todo esto hace necesario un nuevo punto de vista con el que abordar los efectos de los estrógenos y sus mecanismos. Para ello es imprescindible desarrollar nuevas herramientas con las que poder distinguir claramente la participación de los receptores de membrana o los intracelulares en cada uno de esos efectos, así como los mecanismos empleados en cada caso.

## **CONCLUSIONES**

1.- Una concentración fisiológica de  $17\beta$ -estradiol produce un aumento de la concentración de calcio intracelular en el islote de Langerhans de ratón, que se manifiesta como un aumento en la frecuencia de las oscilaciones mostradas por el islote en presencia de 8mM glucosa o bien como un aumento en la duración de dichas oscilaciones.

2.- El  $17\beta$ -estradiol produce un aumento en los niveles de GMPc en el islote de Langerhans en presencia de 8mM glucosa. Este aumento es similar al producido por 11mM glucosa.

3.- El GMPc modula negativamente el canal de potasio dependiente de ATP de una forma similar a como lo hace el  $17\beta$ -estradiol. Este efecto no se debe a una interacción directa del nucleótido cíclico con el canal, sino a la activación de vías intracelulares de señalización.

4.- El canal de potasio dependiente de ATP es modulado negativamente por una fosforilación dependiente de PKG, activada por estradiol.

5.- La vía de señalización del AMPc y la PKA no participan en el efecto del  $17\beta$ -estradiol en las células  $\beta$  del islote de Langerhans de ratón.

6.- Concentraciones fisiológicas de  $17\beta$ -estradiol suprime las oscilaciones de calcio intracelular que presentan las células  $\alpha$  pancreáticas en ausencia de glucosa.

7.- El receptor de estrógenos presente en la membrana plasmática de las células  $\alpha$  y  $\beta$  es el responsable del efecto del estradiol en la concentración de calcio intracelular en ambos tipos celulares.

8.- El receptor de estrógenos de membrana descrito en las células  $\alpha$  y  $\beta$  del islote de Langerhans de ratón ejerce dos efectos opuestos en ambos tipos celulares, que sin embargo, conducen a un mismo efecto fisiológico: la disminución de la concentración de glucosa en sangre.

9.- El receptor de estrógenos de membrana presente en las células  $\alpha$  y  $\beta$  pancreáticas no es ninguno de los receptores de estrógenos intracelulares, RE $\alpha$  o RE $\beta$ .

10.- Este receptor de estrógenos de membrana no clásico es compartido por catecolestrógenos y por las catecolaminas dopamina, adrenalina y noradrenalina. No es ninguno de los receptores clásicos adrenérgicos, ni dopaminérgicos, sino que tiene el perfil farmacológico del llamado receptor  $\gamma$ -adrenérgico.

## **REFERENCIAS**

- Aerts L, van Assche FA, Faure A, Sutter-Dub MT (1980) Effects of treatment with progesterone and oestradiol-17 beta on the endocrine pancreas in ovariectomized rats: ultrastructural variations in the B cells. *J Endocrinol* 84: 317-20.
- Aguilar-Bryan L, Clement JP 4th, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J (1998) Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. *Physiol Rev* 78: 227-45.
- Aizawa T, Komatsu M, Asanuma N, Sato Y, Sharp GW (1998) Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell. *Trends Pharmacol Sci* 19: 496-9.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Molecular biology of the cell*. 3<sup>a</sup> edición. Garland Publishing, Inc.: New York.
- Alonso R, Lopez-Coviella I (1998) Gonadal steroids and neuronal function. *Neurochem Res* 23: 675-88.
- Ammala C, Ashcroft FM, Rorsman P (1993) Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single beta-cells. *Nature* 363: 356-8.
- Andersson B, Mattsson LA, Hahn L, Marin P, Lapidus L, Holm G, Bengtsson BA, Bjorntorp P (1997) Estrogen replacement therapy decreases hyperandrogenicity and improves glucose homeostasis and plasma lipids in postmenopausal women with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 638-43.
- Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS (1994) Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8517-21.
- Asaithambi A, Mukherjee S, Thakur MK (1997) Expression of 112-kDa estrogen receptor in mouse brain cortex and its autoregulation with age. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 683-5.
- Ashcroft FM, Gribble FM (1999) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 42: 903-19.
- Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312: 446-8.
- Ashcroft FM, Rorsman P (1989) Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54: 87-143.
- Barbosa RM, Silva AM, Tome AR, Stamford JA, Santos RM, Rosario LM (1998) Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J Physiol (Lond)* 510 ( Pt 1): 135-43.
- Barbosa RM, Silva AM, Tome AR, Stamford JA, Santos RM, Rosario LM (1996) Real time electrochemical detection of 5-HT/insulin secretion from single pancreatic islets: effect of glucose and K<sup>+</sup> depolarization. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 100-4.
- Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S (1998) Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen

- agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 54: 105-12.
- Batra S (1986) Effect of estrogen and progesterone treatment on calcium uptake by the myometrium and smooth muscle of the lower urinary tract. *Eur J Pharmacol* 127: 37-42.
- Beato M (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-44.
- Beguín P, Nagashima K, Nishimura M, Gonoï T, Seino S (1999) PKA-mediated phosphorylation of the human K(ATP) channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J* 18: 4722-32.
- Benham CD, Tsien RW (1988) Noradrenaline modulation of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery. *J Physiol (Lond)* 404: 767-84.
- Benten WP, Lieberherr M, Giese G, Wunderlich F (1998) Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells. *FEBS Lett* 422: 349-53.
- Benten WP, Stephan C, Lieberherr M, Wunderlich F (2001) Estradiol signaling via sequestrable surface receptors. *Endocrinology* 142: 1669-77.
- Berthois Y, Pourreau-Schneider N, Gandilhon P, Mittre H, Tubiana N, Martin PM (1986) Estradiol membrane binding sites on human breast cancer cell lines. Use of a fluorescent estradiol conjugate to demonstrate plasma membrane binding systems. *J Steroid Biochem* 25: 963-72.
- Berts A, Ball A, Gylfe E, Hellman B (1996) Suppression of Ca<sup>2+</sup> oscillations in glucagon-producing alpha 2-cells by insulin/glucose and amino acids. *Biochim Biophys Acta* 1310: 212-6.
- Berts A, Gylfe E, Hellman B (1995) Ca<sup>2+</sup> oscillations in pancreatic islet cells secreting glucagon and somatostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 644-9.
- Berts A, Gylfe E, Hellman B (1997) Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in glucagon-producing pancreatic alpha-cells exposed to carbachol and agents affecting Na<sup>+</sup> fluxes. *Endocrine* 6: 79-83.
- Beyer C, Karolczak M (2000) Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signalling. *J Neurosci Res* 59: 107-16.
- Beyer C, Raab H (1998) Nongenomic effects of oestrogen: embryonic mouse midbrain neurones respond with a rapid release of calcium from intracellular stores. *Eur J Neurosci* 10: 255-62.
- Bi R, Broutman G, Foy MR, Thompson RF, Baudry M (2000) The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3602-7.
- Bokvist K, Olsen HL, Hoy M, Gotfredsen CF, Holmes WF, Buschard K, Rorsman P, Gromada J (1999) Characterisation of sulphonylurea and ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in rat pancreatic A-cells. *Pflugers Arch* 438: 428-36.
- Bression D, Michard M, Le Dafniet M, Pagesy P, Peillon F (1986) Evidence for a specific



- estradiol binding site on rat pituitary membranes. *Endocrinology* 119: 1048-51.
- Brubaker KD, Gay CV (1994) Specific binding of estrogen to osteoclast surfaces. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 899-907.
- Brunicardi FC, Druck P, Seymour NE, Sun YS, Elahi D, Andersen DK (1990) Selective neurohormonal interactions in islet cell secretion in the isolated perfused human pancreas. *J Surg Res* 48: 273-8.
- Brussaard HE, Gevers Leuven JA, Frolich M, Kluft C, Krans HM (1997) Short-term oestrogen replacement therapy improves insulin resistance, lipids and fibrinolysis in postmenopausal women with NIDDM. *Diabetologia* 40: 843-9.
- Buitrago C, Massheimer V, de Boland AR (2000) Acute modulation of Ca<sup>2+</sup> influx on rat heart by 17beta-estradiol. *Cell Signal* 12: 47-52.
- Bukusoglu C, Krieger NR (1994) Photoaffinity labeling with progesterone-11 alpha-hemisuccinate- (2-. *J Neurochem* 63: 1434-8.
- Burns CJ, Howell SL, Jones PM, Persaud SJ (1997) Glucose-stimulated insulin secretion from rat islets of Langerhans is independent of mitogen-activated protein kinase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 447-50.
- Caldwell JD, Walker CH, Rivkina A, Pedersen CA, Mason GA (1999) Radioligand assays for oestradiol and progesterone conjugated to protein reveal evidence for a common membrane binding site in the medial preoptic area-anterior hypothalamus and differential modulation by cholera toxin and GTPgammaS. *J Neuroendocrinol* 11: 409-17.
- Cario-Toumaniantz C, Loirand G, Ferrier L, Pacaud P (1998) Non-genomic inhibition of human P2X7 purinoceptor by 17beta-oestradiol. *J Physiol* 508 ( Pt 3): 659-66.
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP (2000) Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 184: 409-20.
- Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR (1997) 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res* 81: 885-92.
- Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, Mendelsohn ME, Anderson RG, Shaul PW (2000) Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res* 87: E44-52.
- Chang AS, Chang SM (1999) Nongenomic steroidal modulation of high-affinity serotonin transport. *Biochim Biophys Acta* 1417: 157-66.
- Charles MA, Lawecki J, Pictet R, Grodsky GM (1975) Insulin secretion. Interrelationships of glucose, cyclic adenosine 3:5- monophosphate, and calcium. *J Biol Chem* 250: 6134-40.
- Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW (1999) Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103: 401-6.

- Chen ZJ, Yu L, Chang CH (1998) Stimulation of membrane-bound guanylate cyclase activity by 17-beta estradiol. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 639-42.
- Cheng CY, Rose RJ, Boettcher B (1981) The binding of oestradiol-17beta to human spermatozoa - an electron microscope autoradiographic study. *Int J Androl* 4: 304-13.
- Chiodo LA, Caggiula AR (1980) Alterations in basal firing rate and autoreceptor sensitivity of dopamine neurons in the substantia nigra following acute and extended exposure to estrogen. *Eur J Pharmacol* 67: 165-6.
- Christie MR, Ashcroft SJ (1984) Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and insulin secretion in intact islets of Langerhans. *Biochem J* 218: 87-99.
- Chu S, Fuller PJ (1997) Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Mol Cell Endocrinol* 132: 195-9.
- Clarke CH, Norfleet AM, Clarke MS, Watson CS, Cunningham KA, Thomas ML (2000) Perimembrane localization of the estrogen receptor alpha protein in neuronal processes of cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology* 71: 34-42.
- Condliffe SB, Doolan CM, Harvey BJ (2001) 17b-Oestradiol acutely regulates Cl<sup>-</sup> secretion in rat distal colonic epithelium. *J Physiol* 530: 47-54.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS (1999) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286: 2328-31.
- Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20: 358-417.
- Cunningham JM, Mabley JG, Delaney CA, Green IC (1994) The effect of nitric oxide donors on insulin secretion, cyclic GMP and cyclic AMP in rat islets of Langerhans and the insulin-secreting cell lines HIT-T15 and RINm5F. *Mol Cell Endocrinol* 102: 23-9.
- Dachicourt N, Serradas P, Giroix MH, Gangnerau MN, Portha B (1996) Decreased glucose-induced cAMP and insulin release in islets of diabetic rats: reversal by IBMX, glucagon, GIP. *Am J Physiol* 271: E725-32.
- Darkow DJ, Lu L, White RE (1997) Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *Am J Physiol* 272: H2765-73.
- Dean PM, Matthews EK (1968) Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* 219: 389-90.
- Debusse M (1998) *Lo esencial en Sistema Endocrino y aparato reproductor*. 1ª edición. Harcourt Brace: Madrid.
- Dechering K, Boersma C, Mosselman S (2000) Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? *Curr Med Chem* 7: 561-76.
- Di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, Migliaccio A, Auricchio F (1996) Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. *Cancer Res* 56: 4516-

21.

Ding WG, Gromada J (1997) Protein kinase A-dependent stimulation of exocytosis in mouse pancreatic beta-cells by glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *Diabetes* 46: 615-21.

Ding WG, Renstrom E, Rorsman P, Buschard K, Gromada J (1997) Glucagon-like peptide I and glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulate Ca<sup>2+</sup>-induced secretion in rat alpha-cells by a protein kinase A-mediated mechanism. *Diabetes* 46: 792-800.

Disshon KA, Dluzen DE (1997) Estrogen as a neuromodulator of MPTP-induced neurotoxicity: effects upon striatal dopamine release. *Brain Res* 764: 9-16.

Doolan CM, Condliffe SB, Harvey BJ (2000) Rapid non-genomic activation of cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase activity and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> by 17beta-oestradiol in female rat distal colon. *Br J Pharmacol* 129: 1375-86.

Dopp E, Vollmer G, Hahnel C, Grevesmuhl Y, Schiffmann D (1999) Modulation of the intracellular calcium level in mammalian cells caused by 17beta-estradiol, different phytoestrogens and the anti-estrogen ICI 182780. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68: 57-64.

Drouva SV, Laplante E, Kordon C (1983) Effects of ovarian steroids on in vitro release of LHRH from mediobasal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 37: 336-41.

Dufy B, Vincent JD, Fleury H, Du Pasquier P, Gourdj D, Tixier-Vidal A (1979) Membrane effects of thyrotropin-releasing hormone and estrogen shown by intracellular recording from pituitary cells. *Science* 204: 509-11.

Dunbar JC, Walsh MF (1982) Glucagon and insulin secretion by dispersed islet cells: possible paracrine relationships. *Horm Res* 16: 257-67.

Dunne MJ, Petersen OH (1986) Intracellular ADP activates K<sup>+</sup> channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett* 208: 59-62.

Edelmann HM, Duchek P, Rosenthal FE, Foger N, Glackin C, Kane SE, Kuchler K (1999) Cmdr1, a chicken P-glycoprotein, confers multidrug resistance and interacts with estradiol. *Biol Chem* 380: 231-41.

Efrat S (1991) Sexual dimorphism of pancreatic beta-cell degeneration in transgenic mice expressing an insulin-ras hybrid gene. *Endocrinology* 128: 897-901.

Endoh H, Sasaki H, Maruyama K, Takeyama K, Waga I, Shimizu T, Kato S, Kawashima H (1997) Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 99-102.

Enmark E, Peltto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, Gustafsson JA (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4258-65.

Etchegoyen GS, Borelli MI, Rossi JP, Gagliardino JJ (1998) Effect of 2-hydroxyoestradiol on insulin secretion in normal rat pancreatic islets. *Diabetes Metab* 24: 428-33.

- Etchegoyen GS, Cardinali DP, Perez AE, Tamayo J, Perez-Palacios G (1986) Binding and effects of catecholestrogens on adenylate cyclase activity, and adrenoceptors, benzodiazepine and GABA receptors in guinea-pig hypothalamic membranes. *Eur J Pharmacol* 129: 1-10.
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-95.
- Falkenstein E, Heck M, Gerdes D, Grube D, Christ M, Weigel M, Buddhikot M, Meizel S, Wehling M (1999) Specific progesterone binding to a membrane protein and related nongenomic effects on Ca<sup>2+</sup>-fluxes in sperm. *Endocrinology* 140: 5999-6002.
- Falkenstein E, Meyer C, Eisen C, Scriba PC, Wehling M (1996) Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 86-9.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M (2000) Multiple actions of steroid hormones-A focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52: 513-56.
- Farhat MY, Abi-Younes S, Dingaam B, Vargas R, Ramwell PW (1996a) Estradiol increases cyclic adenosine monophosphate in rat pulmonary vascular smooth muscle cells by a nongenomic mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 652-7.
- Farhat MY, Abi-Younes S, Ramwell PW (1996b) Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. *Biochem Pharmacol* 51: 571-6.
- Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW (1996c) The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* 10: 615-24.
- Faure A, Haouari M, Sutter BC (1987) Oestradiol and insulin secretion in the rat: when does oestradiol start stimulating the insulin release? *Horm Res* 27: 225-30.
- Faure A, Haouari M, Sutter BC (1988) Short term and direct influence of oestradiol on glucagon secretion stimulated by arginine. *Diabete Metab* 14: 452-4.
- Faure A, Sutter-Dub MT (1979) Insulin secretion from isolated pancreatic islets in the female rat. Short and long term oestradiol influence. *J Physiol (Paris)* 75: 289-95.
- Faure A, Sutter-Dub MT, Sutter BC, Assan R (1983) Ovarian-adrenal interactions in regulation of endocrine pancreatic function in the rat. *Diabetologia* 24: 122-7.
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein- coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14: 1649-60.
- Filipponi P, Gregorio F, Ferrandina C, Nicoletti I, Mannarelli C, Pippi R, Santeusanio F (1986) Alpha-adrenergic system in the modulation of pancreatic A and B cell function in normal rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2: 325-36.
- Fiorelli G, Gori F, Frediani U, Franceschelli F, Tanini A, Tosti-Guerra C, Benvenuti S, Gennari L, Becherini L, Brandi ML (1996) Membrane binding sites and non-genomic

- effects of estrogen in cultured human pre-osteoclastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59: 233-40.
- Flourirot G, Griffin C, Kenealy M, Sonntag-Buck V, Gannon F (1998) Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol Endocrinol* 12: 1939-54.
- Fuchs F, Klopper A. (1982) *Endocrinología de la Gestación*. 2ª edición. Salvat: Barcelona.
- Ganesan S, Calle R, Zawalich K, Greenawalt K, Zawalich W, Shulman GI, Rasmussen H (1992) Immunocytochemical localization of alpha-protein kinase C in rat pancreatic beta-cells during glucose-induced insulin secretion. *J Cell Biol* 119: 313-24.
- Ganesan S, Calle R, Zawalich K, Smallwood JI, Zawalich WS, Rasmussen H (1990) Glucose-induced translocation of protein kinase C in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9893-7.
- Garbers DL, Lowe DG (1994) Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem* 269: 30741-4.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63: 29-60.
- Gefel D, Hendrick GK, Mojsov S, Habener J, Weir GC (1990) Glucagon-like peptide-I analogs: effects on insulin secretion and adenosine 3',5'-monophosphate formation. *Endocrinology* 126: 2164-8.
- Gerdes D, Wehling M, Leube B, Falkenstein E (1998) Cloning and tissue expression of two putative steroid membrane receptors. *Biol Chem* 379: 907-11.
- Germain PS, Metezeau P, Tiefenauer LX, Kiefer H, Ratinaud MH, Habrioux G (1993) Use of a biotinyl-estradiol derivative to demonstrate estradiol- membrane binding sites on adherent human breast cancer MCF-7 cells. *Anticancer Res* 13: 2347-53.
- Gillis KD, Mislser S (1993) Enhancers of cytosolic cAMP augment depolarization-induced exocytosis from pancreatic B-cells: evidence for effects distal to Ca<sup>2+</sup> entry. *Pflugers Arch* 424: 195-7.
- Gilon P, Henquin JC (1992) Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem* 267: 20713-20.
- Goetz RM, Thatte HS, Prabhakar P, Cho MR, Michel T, Golan DE (1999) Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2788-93.
- Gopel S, Kanno T, Barg S, Galvanovskis J, Rorsman P (1999) Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol* 521 Pt 3: 717-28.
- Gopel SO, Kanno T, Barg S, Weng X, Gromada J, Rorsman P (2000) Regulation of glucagon release in mouse -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na<sup>+</sup> channels. *J Physiol* 528: 509-520.

- Goyache FM, Gutierrez M, Hidalgo A, Cantabrana B (1995) Non-genomic effects of catecholestrogens in the in vitro rat uterine contraction. *Gen Pharmacol* 26: 219-23.
- Graber R, Sumida C, Vallette G, Nunez EA (1993) Rapid and long-term effects of 17 beta-estradiol on PIP<sub>2</sub>-phospholipase C-specific activity of MCF-7 cells. *Cell Signal* 5: 181-6.
- Grandien KF, Berkenstam A, Nilsson S, Gustafsson JA (1993) Localization of DNase I hypersensitive sites in the human oestrogen receptor gene correlates with the transcriptional activity of two differentially used promoters. *J Mol Endocrinol* 10: 269-77.
- Green IC, Delaney CA, Cunningham JM, Karmiris V, Southern C (1993) Interleukin-1 beta effects on cyclic GMP and cyclic AMP in cultured rat islets of Langerhans-arginine-dependence and relationship to insulin secretion. *Diabetologia* 36: 9-16.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320: 134-9.
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231: 1150-4.
- Griffin C, Flouriot G, Sonntag-Buck V, Nestor P, Gannon F (1998) Identification of novel chicken estrogen receptor-alpha messenger ribonucleic acid isoforms generated by alternative splicing and promoter usage. *Endocrinology* 139: 4614-25.
- Grill V, Cerasi E (1973) Activation by glucose of adenyl cyclase in pancreatic islets of the rat. *FEBS Lett* 33: 311-4.
- Gromada J, Hoy M, Olsen HL, Gotfredsen CF, Buschard K, Rorsman P, Bokvist K (2001) Gi2 proteins couple somatostatin receptors to low-conductance K<sup>+</sup> channels in rat pancreatic alpha-cells. *Pflugers Arch* 442: 19-26.
- Gu Q, Korach KS, Moss RL (1999) Rapid action of 17beta-estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. *Endocrinology* 140: 660-6.
- Gu Q, Moss RL (1996) 17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *J Neurosci* 16: 3620-9.
- Gu Q, Moss RL (1998) Novel mechanism for non-genomic action of 17 beta-oestradiol on kainate-induced currents in isolated rat CA1 hippocampal neurones. *J Physiol (Lond)* 506 ( Pt 3): 745-54.
- Hadley ME (1997) *Endocrinología*. 1ª edición. Prentice Hall: Madrid.
- Halban PA, Wollheim CB, Blondel B, Meda P, Niesor EN, Mintz DH (1982) The possible importance of contact between pancreatic islet cells for the control of insulin release. *Endocrinology* 111: 86-94.
- Hanstein B, Liu H, Yancisin MC, Brown M (1999) Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform. *Mol Endocrinol* 13: 129-37.

Haouari M, Faure A, Sutter BC (1986) Oestradiol inhibits the insulin secretion on the first day of treatment in the ovariectomized rat. *Horm Metab Res* 18: 143-4.

Hardy SP, Valverde MA (1994) Novel plasma membrane action of estrogen and antiestrogens revealed by their regulation of a large conductance chloride channel. *FASEB J* 8: 760-5.

Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P (2000) Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10751-6.

Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR (2000) Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 87: 677-82.

Henquin JC (1980) Tolbutamide stimulation and inhibition of insulin release: studies of the underlying ionic mechanisms in isolated rat islets. *Diabetologia* 18: 151-60.

Hernandez-Perez O, Ballesteros LM, Rosado A (1979) Binding of 17-beta-estradiol to the outer surface and nucleus of human spermatozoa. *Arch Androl* 3: 23-9.

Hirata S, Koh T, Yamada-Mouri N, Kato J (1996) The novel untranslated first exon "exon 0N" of the rat estrogen receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 849-54.

Hirst GD, Neild TO (1980) Evidence for two populations of excitatory receptors for noradrenaline on arteriolar smooth muscle. *Nature* 283: 767-8.

Hirst GD, Neild TO, Silverberg GD (1982) Noradrenaline receptors on the rat basilar artery. *J Physiol (Lond)* 328: 351-60.

<http://www.novo.dk/hri>

<http://www.britannica.com>

<http://www.rae.es>

Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4686-91.

Jaspan JB, Lever E, Polonsky KS, Van Cauter E (1986) In vivo pulsatility of pancreatic islet peptides. *Am J Physiol* 251: E215-26.

Jiang MS, Hart GW (1997) A subpopulation of estrogen receptors are modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 272: 2421-8.

Johansson H, Gylfe E, Hellman B (1987) The actions of arginine and glucose on glucagon secretion are mediated by opposite effects on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* 147: 309-14.

Jones PM, Persaud SJ (1998) Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation

of insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Endocr Rev* 19: 429-61.

Jones PM, Persaud SJ, Bjaaland T, Pearson JD, Howell SL (1992) Nitric oxide is not involved in the initiation of insulin secretion from rat islets of Langerhans. *Diabetologia* 35: 1020-7.

Jones PM, Persaud SJ, Howell SL (1991) Protein kinase C and the regulation of insulin secretion from pancreatic B cells. *J Mol Endocrinol* 6: 121-7.

Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS (1996) Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol Endocrinol* 10: 119-31.

Kelly MJ, Kuhnt U, Wuttke W (1980) Hyperpolarization of hypothalamic parvocellular neurons by 17 beta- estradiol and their identification through intracellular staining with procion yellow. *Exp Brain Res* 40: 440-7.

Kelly MJ, Lagrange AH, Wagner EJ, Ronnekleiv OK (1999) Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. *Steroids* 64: 64-75.

Kelly MJ, Moss RL, Dudley CA (1977) The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Exp Brain Res* 30: 53-64.

Kiekens R, In 't Veld P, Mahler T, Schuit F, Van De Winkel M, Pipeleers D (1992) Differences in glucose recognition by individual rat pancreatic B cells are associated with intercellular differences in glucose-induced biosynthetic activity. *J Clin Invest* 89: 117-25.

Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I (1999) Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 257-62.

Kim YJ, Hur EM, Park TJ, Kim KT (2000) Nongenomic inhibition of catecholamine secretion by 17beta-estradiol in PC12 cells. *J Neurochem* 74: 2490-6

Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K, Gaznabi AK (1997) Non-genomic mechanism of 17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *J Physiol* 499 ( Pt 2): 497-511.

Klinterberg KA, Karlsson S, Ahren B (1996) Signaling mechanisms underlying the insulinotropic effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in HIT-T15 cells. *Endocrinology* 137: 2791-8.

Koike S, Sakai M, Muramatsu M (1987) Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res* 15: 2499-513.

Krippeit-Drews P, Kroncke KD, Welker S, Zempel G, Roenfeldt M, Ammon HP, Lang F, Drews G (1995) The effects of nitric oxide on the membrane potential and ionic currents of mouse pancreatic B cells. *Endocrinology* 136: 5363-9.

Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P (1986) The



- chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* 5: 891-7.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5925-30.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863-70.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139: 4252-63.
- Kuiper GG, Gustafsson JA (1997) The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 410: 87-90.
- Kuroki Y, Fukushima K, Kanda Y, Mizuno K, Watanabe Y (2000) Putative membrane-bound estrogen receptors possibly stimulate mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 400: 205-9.
- Lagrange AH, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (1995) Estradiol-17 beta and mu-opioid peptides rapidly hyperpolarize GnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback? *Endocrinology* 136: 2341-4.
- Lagrange AH, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (1997) Modulation of G protein-coupled receptors by an estrogen receptor that activates protein kinase A. *Mol Pharmacol* 51: 605-12.
- Lagrange AH, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (1994) The potency of mu-opioid hyperpolarization of hypothalamic arcuate neurons is rapidly attenuated by 17 beta-estradiol. *J Neurosci* 14: 6196-204.
- Lagrange AH, Wagner EJ, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (1996) Estrogen rapidly attenuates a GABAB response in hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 64: 114-23.
- Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW (1997) Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 273: L119-26.
- Laychock SG (1987) Effects of guanosine 3',5'-monophosphate on glucose utilization in isolated islets of Langerhans. *Endocrinology* 120: 517-24.
- Laychock SG, Modica ME, Cavanaugh CT (1991) L-arginine stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine:nitric oxide synthase. *Endocrinology* 129: 3043-52.
- Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M (1997) Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J Biol Chem* 272: 11902-7.
- Leclercq-Meyer V, Marchand J, Malaisse WJ (1979) Calcium dependency of glucagon

release: its modulation by nutritional factors. *Am J Physiol* 236: E98-104.

Lee B, Laychock SG (1997) Atrial natriuretic peptide and cyclic nucleotides affect glucose-induced  $Ca^{2+}$  responses in single pancreatic islet beta-cells: correlation with  $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase activity. *Diabetes* 46: 1312-8.

Lieberherr M, Grosse B, Kachkache M, Balsan S (1993) Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. *J Bone Miner Res* 8: 1365-76.

Lin YF, Jan YN, Jan LY (2000) Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells. *EMBO J* 19: 942-55.

Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22: 307-12.

Loomis AK, Thomas P (2000) Effects of estrogens and xenoestrogens on androgen production by Atlantic croaker testes in vitro: evidence for a nongenomic action mediated by an estrogen membrane receptor. *Biol Reprod* 62: 995-1004.

Luconi M, Muratori M, Forti G, Baldi E (1999) Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1670-8.

MacDonald MJ, Fahien LA (1988) Glyceraldehyde phosphate and methyl esters of succinic acid. Two "new" potent insulin secretagogues. *Diabetes* 37: 997-9.

Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232: 1004-7.

Marino M, Pallottini V, Trentalance A (1998) Estrogens cause rapid activation of IP3-PKC-alpha signal transduction pathway in HEPG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 254-8.

Maruyama K, Endoh H, Sasaki-Iwaoka H, Kanou H, Shimaya E, Hashimoto S, Kato S, Kawashima H (1998) A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regulator of estrogen action. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 142-7.

Massas R, Korenstein R, Benayahu D (1998) Estrogen modulation of osteoblastic cell-to-cell communication. *J Cell Biochem* 69: 282-90.

McEwen BS, Alves SE (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20: 279-307.

McNamara B, Winter DC, Cuffe J, Taylor C, O'Sullivan GC, Harvey BJ (2000) Rapid activation of basolateral potassium transport in human colon by oestradiol. *Br J Pharmacol* 131: 1373-8.

Meda P, Kohen E, Kohen C, Rabinovitch A, Orci L (1982) Direct communication of homologous and heterologous endocrine islet cells in culture. *J Cell Biol* 92: 221-6.

- Mendelsohn ME, Karas RH (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340: 1801-11.
- Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ (1996) Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci* 16: 595-604.
- Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F (2000) Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J* 19: 5406-17.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol- receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15: 1292-300.
- Minami T, Oomura Y, Nabekura J, Fukuda A (1990) 17 beta-estradiol depolarization of hypothalamic neurons is mediated by cyclic AMP. *Brain Res* 519: 301-7.
- Misler S, Falke LC, Gillis K, McDaniel ML (1986) A metabolite-regulated potassium channel in rat pancreatic B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7119-23.
- Moats RK, Ramirez VD (2000) Electron microscopic visualization of membrane-mediated uptake and translocation of estrogen-BSA:colloidal gold by hep G2 cells. *J Endocrinol* 166: 631-47.
- Moini H, Bilsel S, Bekdemir T, Emerk K (1997) 17 beta-Estradiol increases intracellular free calcium concentrations of human vascular endothelial cells and modulates its responses to acetylcholine. *Endothelium* 5: 11-9.
- Monje P, Boland R (1999) Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus. *Mol Cell Endocrinol* 147: 75-84.
- Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Klierer SA, Lehmann JM, Willson TM (1998) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 75-8.
- Morey AK, Pedram A, Razandi M, Prins BA, Hu RM, Biesiada E, Levin ER (1997) Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation. *Endocrinology* 138: 3330-9.
- Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL (1992) A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* 131: 1305-12.
- Moss RL, Gu Q, Wong M (1997) Estrogen: nontranscriptional signaling pathway. *Recent Prog Horm Res* 52: 33-68; discussion 68-9.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392: 49-53.
- Mugge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR (1993) Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro. *Cardiovasc Res* 27:

1939-42.

Muramatsu M, Inoue S (2000) Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun* 270: 1-10.

Nabekura J, Oomura Y, Minami T, Mizuno Y, Fukuda A (1986) Mechanism of the rapid effect of 17 beta-estradiol on medial amygdala neurons. *Science* 233: 226-8.

Nadal, A., Diaz, M., and Valverde, M. A. (2001) The estrogen trinity: membrane, cytosolic and nuclear effects. *News Physiol Sci*. In press.

Nadal A, Quesada I, Soria B (1999) Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol (Lond)* 517 ( Pt 1): 85-93.

Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E, Soria B (2000) Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11603-8.

Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C, Soria B (1998) Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J* 12: 1341-8.

Nelson MT, Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268: C799-822.

Newgard CB, McGarry JD (1995) Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 64: 689-719.

Nilsson BO, Ekblad E, Heine T, Gustafsson J (2000) Increased magnitude of relaxation to oestrogen in aorta from oestrogen receptor beta knock-out mice. *J Endocrinol* 166: R5-9.

Norfleet AM, Clarke CH, Gametchu B, Watson CS (2000) Antibodies to the estrogen receptor-alpha modulate rapid prolactin release from rat pituitary tumor cells through plasma membrane estrogen receptors. *FASEB J* 14: 157-65.

Norfleet AM, Thomas ML, Gametchu B, Watson CS (1999) Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde- fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology* 140: 3805-14.

Norman AW, Wehling M (1999) Overview of the First International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones. *Steroids* 64: 3-4.

Ogata R, Inoue Y, Nakano H, Ito Y, Kitamura K (1996) Oestradiol-induced relaxation of rabbit basilar artery by inhibition of voltage-dependent Ca channels through GTP-binding protein. *Br J Pharmacol* 117: 351-9.

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

Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, Walker VR, Gustafsson JA, Smithies O, Korach KS,

- Pfaff DW (2000) From the cover: abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14737-41.
- Oliver JR, Williams VL, Wright PH (1976) Studies on glucagon secretion using isolated islets of Langerhans of the rat. *Diabetologia* 12: 301-6.
- Opara EC, Atwater I, Go VL (1988) Characterization and control of pulsatile secretion of insulin and glucagon. *Pancreas* 3: 484-7.
- Orci L, Unger RH (1975) Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet* 2: 1243-4.
- Ostenson CG (1980) Alloxan reversibly impairs glucagon release and glucose oxidation by pancreatic A2-cells. *Biochem J* 188: 201-6.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277: 1508-10.
- Pappas TC, Gametchu B, Watson CS (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 9: 404-10.
- Persaud SJ, Jones PM, Howell SL (1990) Glucose-stimulated insulin secretion is not dependent on activation of protein kinase A. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 833-9.
- Persaud SJ, Wheeler-Jones CP, Jones PM (1996) The mitogen-activated protein kinase pathway in rat islets of Langerhans: studies on the regulation of insulin secretion. *Biochem J* 313 ( Pt 1): 119-24.
- Petersen DN, Tkalcevic GT, Koza-Taylor PH, Turi TG, Brown TA (1998) Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. *Endocrinology* 139: 1082-92.
- Picotto G, Massheimer V, Boland R (1996) Acute stimulation of intestinal cell calcium influx induced by 17 beta- estradiol via the cAMP messenger system. *Mol Cell Endocrinol* 119: 129-34.
- Picotto G, Vazquez G, Boland R (1999) 17beta-oestradiol increases intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in rat enterocytes. Potential role of phospholipase C-dependent store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem J* 339 ( Pt 1): 71-7.
- Pietras RJ, Szego CM (1975) Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature* 253: 357-9.
- Pietras RJ, Szego CM (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265: 69-72.
- Pipeleers D, in't Veld PI, Maes E, Van De Winkel M (1982) Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7322-5.

- Pipeleers DG (1992) Heterogeneity in pancreatic beta-cell population. *Diabetes* 41: 777-81.
- Pratt WB, Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18: 306-60.
- Prentki M, Matschinsky FM (1987) Ca<sup>2+</sup>, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* 67: 1185-248.
- Prevot V, Croix D, Rialas CM, Poulain P, Fricchione GL, Stefano GB, Beauvillain JC (1999) Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology* 140: 652-9.
- Pritchard JA, MacDonald PC (1981) *Obstetricia*. 2ª edición. Salvat: Barcelona.
- Quesada I, Nadal A, Soria B (1999) Different effects of tolbutamide and diazoxide in alpha, beta-, and delta-cells within intact islets of Langerhans. *Diabetes* 48: 2390-7.
- Ramirez VD (1992) Characterization of membrane action of steroids. *Neuroprotocols Comp. Methods Neurosci.* 1: 35-41.
- Ramirez VD, Zheng J (1996) Membrane sex-steroid receptors in the brain. *Front Neuroendocrinol* 17: 402-39.
- Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13: 307-19.
- Razandi M, Pedram A, Levin ER (2000a) Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol* 14: 1434-47.
- Razandi M, Pedram A, Levin ER (2000b) Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *J Biol Chem* 275: 38540-6.
- Ripoll C, Martin F, Manuel Rovira J, Pintor J, Miras-Portugal MT, Soria B (1996) Diadenosine polyphosphates. A novel class of glucose-induced intracellular messengers in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 45: 1431-4.
- Roosen-Runge G, Epler M, Duker E, Fuchs E, Siegel RA, Demling J, Wuttke W (1984) In vivo release of neurotransmitters in the medial basal hypothalamus of the monkey. *Exp Brain Res* 54: 575-8.
- Rorsman P, Hellman B (1988) Voltage-activated currents in guinea pig pancreatic alpha 2 cells. Evidence for Ca<sup>2+</sup>-dependent action potentials. *J Gen Physiol* 91: 223-42.
- Rosario LM, Atwater I, Scott AM (1986) Pulsatile insulin release and electrical activity from single ob/ob mouse islets of Langerhans. *Adv Exp Med Biol* 211: 413-25.
- Rusko J, Li L, van Breemen C (1995) 17-beta-Estradiol stimulation of endothelial K<sup>+</sup> channels. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 367-72.

- Russell KS, Haynes MP, Caulin-Glaser T, Rosneck J, Sessa WC, Bender JR (2000a) Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release. *J Biol Chem* 275: 5026-30.
- Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR (2000b) Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5930-5.
- Salomon D, Meda P (1986) Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual B cells. *Exp Cell Res* 162: 507-20.
- Sanchez-Bueno A, Sancho MJ, Cobbold PH (1991) Progesterone and oestradiol increase cytosolic Ca<sup>2+</sup> in single rat hepatocytes. *Biochem J* 280 ( Pt 1): 273-6.
- Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M (1991) Widespread synchronous [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* 418: 417-22.
- Schaeffer JM, Stevens S, Smith RG, Hsueh AJ (1980) Binding of 2-hydroxyestradiol to rat anterior pituitary cell membranes. *J Biol Chem* 255: 9838-43.
- Schmidt BM, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M (2000) Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol* 21: 57-94.
- Schwarz S, Pohl P (1994) Steroids and opioid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 48: 391-402.
- Sharp GW (1979) The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release. *Diabetologia* 16: 287-96.
- Shaw L, Taggart MJ, Austin C (2000) Mechanisms of 17 beta-oestradiol induced vasodilatation in isolated pressurized rat small arteries. *Br J Pharmacol* 129: 555-65.
- Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci* 19: 2455-63.
- Singh M, Setalo G, Guan X, Warren M, Toran-Allerand CD (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci* 19: 1179-88.
- Singh M, Setalo G Jr, Guan X, Frail DE, Toran-Allerand CD (2000) Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor-alpha knock-out mice. *J Neurosci* 20: 1694-700.
- Singh S, Gupta PD (1997) Induction of phosphoinositide-mediated signal transduction pathway by 17 beta-oestradiol in rat vaginal epithelial cells. *J Mol Endocrinol* 19: 249-57.
- Sirotkin AV, Nitray J (1993) Steroid hormones regulate cAMP and cGMP production by porcine granulosa cells in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46: 573-7.

- Sorenson RL, Brelje TC, Roth C (1993) Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology* 133: 2227-34.
- Spinas GA (1999) The dual role of nitric oxide in islet  $\beta$ -cells. *News in Physiological Sciences* 14: 49-51.
- Spinas GA, Laffranchi R, Francoys I, David I, Richter C, Reinecke M (1998) The early phase of glucose-stimulated insulin secretion requires nitric oxide. *Diabetologia* 41: 292-9.
- Stefano GB, Cadet P, Breton C, Goumon Y, Prevot V, Dessaint JP, Beauvillain JC, Roumier AS, Welters I, Salzet M (2000) Estradiol-stimulated nitric oxide release in human granulocytes is dependent on intracellular calcium transients: evidence of a cell surface estrogen receptor. *Blood* 95: 3951-8.
- Stevenson JC, Crook D, Godsland IF, Collins P, Whitehead MI (1994) Hormone replacement therapy and the cardiovascular system. Nonlipid effects. *Drugs* 47 Suppl 2: 35-41.
- Stavis PE, Deecher DC, Suhadolnik L, Mallis LM, Frail DE (1999) Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. *Endocrinology* 140: 5455-8.
- Straub SG, Sharp GW (1996) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulates insulin secretion via increased cyclic AMP and  $[Ca^{2+}]_i$  and a wortmannin-sensitive signalling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 369-74.
- Sutter-Dub MT (1979) Effects of pregnancy and progesterone and/or oestradiol on the insulin secretion and pancreatic insulin content in the perfused rat pancreas. *Diabete Metab* 5: 47-56.
- Sutter-Dub MT, Faure A, Aerts L, Van Assche FA (1978) Effects of progesterone and 17-beta-oestradiol treatments on the pancreatic B cell castrated female rats. Biochemical variations. *J Physiol (Paris)* 74: 725-30.
- Sutter-Dub MT (1976) Preliminary report: effects of female sex hormones on insulin secretion by the perfused rat pancreas. *J Physiol (Paris)* 72: 795-800.
- Sylvia VL, Hughes T, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z (1998) 17beta-estradiol regulation of protein kinase C activity in chondrocytes is sex-dependent and involves nongenomic mechanisms. *J Cell Physiol* 176: 435-44.
- Szego CM, Davis JS (1967) Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58: 1711-8.
- Tanabe S, Hata T, Hiraoka M (1999) Effects of estrogen on action potential and membrane currents in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol* 277: H826-33.
- Tesarik J, Mendoza C (1995) Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1438-43.
- Thams P, Capito K, Hedekov CJ (1988) Stimulation by glucose of cyclic AMP



- accumulation in mouse pancreatic islets is mediated by protein kinase C. *Biochem J* 253: 229-34.
- Towle AC, Sze PY (1983) Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *J Steroid Biochem* 18: 135-43.
- Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 11: 353-65.
- Tsai MJ, O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63: 451-86.
- Tsuura Y, Ishida H, Hayashi S, Sakamoto K, Horie M, Seino Y (1994) Nitric oxide opens ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels through suppression of phosphofructokinase activity and inhibits glucose-induced insulin release in pancreatic beta cells. *J Gen Physiol* 104: 1079-98.
- Uki M, Nabekura J, Akaike N (1999) Suppression of the nicotinic acetylcholine response in rat superior cervical ganglionic neurons by steroids. *J Neurochem* 72: 808-14.
- Valdeolmillos M, Nadal A, Soria B, Garcia-Sancho J (1993) Fluorescence digital image analysis of glucose-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes* 42: 1210-4.
- Valdeolmillos M, Santos RM, Contreras D, Soria B, Rosario LM (1989) Glucose-induced oscillations of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett* 259: 19-23.
- Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R (1999) Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285: 1929-31.
- Vandewalle B, Hornez L, Lefebvre J (1988) Characterization of catecholesterogen membrane binding sites in estrogen receptor positive and negative human breast cancer cell-lines. *J Recept Res* 8: 699-712.
- Vara E, Tamarit-Rodriguez J (1991) Does cyclic guanosine monophosphate mediate noradrenaline-induced inhibition of islet insulin secretion stimulated by glucose and palmitate? *Biochem J* 278 ( Pt 1): 243-8.
- Verrecchia F, Herve JC (1997) Reversible inhibition of gap junctional communication elicited by several classes of lipophilic compounds in cultured rat cardiomyocytes. *Can J Cardiol* 13: 1093-100.
- Verspohl EJ, Bernemann IK (1996) Atrial natriuretic peptide (ANP)-induced inhibition of glucagon secretion: mechanism of action in isolated rat pancreatic islets. *Peptides* 17: 1023-9.
- Wakeling AE, Dukes M, Bowler J (1991) A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 51: 3867-73.

- Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, et al (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7889-93.
- Wang H, Ward AR, Morris JF (1995) Oestradiol acutely stimulates exocytosis of oxytocin and vasopressin from dendrites and somata of hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience* 68: 1179-88.
- Watanabe Y (1990) [Effects of estrogen on pancreatic endocrine function after major resection of a fibrotic pancreas caused by ligation of the pancreatic ducts in dogs]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 91: 864-74.
- Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM (1997) Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c- fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138: 4030-3.
- Wehling M (1997) Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 59: 365-93.
- Welch RD, Gorski J (1999) Regulation of glucose transporters by estradiol in the immature rat uterus. *Endocrinology* 140: 3602-8.
- Wenham RM, Landt M, Easom RA (1994) Glucose activates the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in isolated rat pancreatic islets. *J Biol Chem* 269: 4947-52.
- Wesslen N, Pipeleers D, Van de Winkel M, Rorsman P, Hellman B (1987) Glucose stimulates the entry of Ca<sup>2+</sup> into the insulin-producing beta cells but not into the glucagon-producing alpha 2 cells. *Acta Physiol Scand* 131: 230-4.
- Wetzel CH, Hermann B, Behl C, Pestel E, Rammes G, Zieglgansberger W, Holsboer F, Rupprecht R (1998) Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Endocrinol* 12: 1441-51.
- White R, Lees JA, Needham M, Ham J, Parker M (1987) Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1: 735-44.
- White RE, Darkow DJ, Lang JL (1995) Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res* 77: 936-42.
- Wilkinson M, Siau M, Horackova M (1995) Modulation of cardiac M2 muscarinic receptor binding by progesterone-related steroids. *J Mol Cell Cardiol* 27: 1831-9.
- Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Liu Y (2001) Estrogens: Trophic and Protective Factors in the Adult Brain. *Front Neuroendocrinol* 22: 33-66.
- Wollheim CB, Sharp GW (1981) Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev* 61: 914-73.
- Wong M, Moss RL (1991) Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid, 17 beta-estradiol, on CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus.

*Brain Res* 543: 148-52.

Wong M, Moss RL (1994) Patch-clamp analysis of direct steroidal modulation of glutamate receptor-channels. *J Neuroendocrinol* 6: 347-55.

Xiao L, Becker JB (1998) Effects of estrogen agonists on amphetamine-stimulated striatal dopamine release. *Synapse* 29: 379-91.

Yaekura K, Kakei M, Yada T (1996) cAMP-signaling pathway acts in selective synergism with glucose or tolbutamide to increase cytosolic Ca<sup>2+</sup> in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes* 45: 295-301.

Yawo H (1999) Involvement of cGMP-dependent protein kinase in adrenergic potentiation of transmitter release from the calyx-type presynaptic terminal. *J Neurosci* 19: 5293-300.

Yawo H (1996) Noradrenaline modulates transmitter release by enhancing the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of exocytosis in the chick ciliary presynaptic terminal. *J Physiol (Lond)* 493 ( Pt 2): 385-91.

Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N (1998) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 274: C25-37.

Zakon HH (1998) The effects of steroid hormones on electrical activity of excitable cells. *Trends Neurosci* 21: 202-7.

Zhang F, Ram JL, Standley PR, Sowers JR (1994) 17 beta-Estradiol attenuates voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol* 266: C975-80.

Zheng J, Ramirez VD (1997) Demonstration of membrane estrogen binding proteins in rat brain by ligand blotting using a 17beta-estradiol-[125I]bovine serum albumin conjugate. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62: 327-36.

Zheng J, Ramirez VD (1999) Purification and identification of an estrogen binding protein from rat brain: oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP), a subunit of mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase/ATPase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68: 65-75.

Zhu M, Mizuno A, Kuwajima M, Ogino T, Murakami T, Noma Y, Sano T, Shima K (1998) Ovarian hormone-induced beta-cell hypertrophy contributes to the homeostatic control of beta-cell mass in OLETF female rat, a model of Type II diabetes. *Diabetologia* 41: 799-805.

Zylinska L, Gromadzinska E, Lachowicz L (1999) Short-time effects of neuroactive steroids on rat cortical Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Biochim Biophys Acta* 1437: 257-64.

Zysek E, Dufy-Barbe L, Dufy B, Vincent JD (1981) Short-term effect of estrogen on release of prolactin by pituitary cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 102: 1151-7.

# **ANEXOS**

## **ANEXO I**

## Non-genomic actions of $17\beta$ -oestradiol in mouse pancreatic $\beta$ -cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase

Ana B. Ropero, Esther Fuentes\*, Juan M. Rovira, Cristina Ripoll, Bernat Soria and Angel Nadal

*Institute of Bioengineering and Department of Physiology and \*Division of Nutrition, Miguel Hernández University, San Juan Campus, Alicante, Spain*

(Received 30 June 1999; accepted after revision 4 October 1999)

1. Intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) was measured in mouse whole islets of Langerhans using the calcium-sensitive fluorescent dye Indo-1.
2. Application of physiological concentrations of  $17\beta$ -oestradiol in the presence of a stimulatory glucose concentration (8 mM) potentiated the  $[Ca^{2+}]_i$  signal in 83% of islets tested. Potentiation was manifested as either an increase in the frequency or duration of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations.
3. The effects caused by  $17\beta$ -oestradiol were mimicked by the cyclic nucleotide analogues 8-bromoguanosine-3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-cGMP) and 8-bromoadenosine-3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-cAMP).
4. Direct measurements of both cyclic nucleotides demonstrated that nanomolar concentrations of  $17\beta$ -oestradiol in the presence of 8 mM glucose increased cGMP levels, yet cAMP levels were unchanged. The increment in cGMP was similar to that induced by 11 mM glucose.
5. Patch-clamp recording in intact cells showed that 8-Br-cGMP reproduced the inhibitory action of  $17\beta$ -oestradiol on ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) channel activity. This was not a membrane-bound effect since it could not be observed in excised patches.
6. The action of  $17\beta$ -oestradiol on  $K_{ATP}$  channel activity was not modified by the specific inhibitor of soluble guanylate cyclase (sGC) LY 83583. This result indicates a likely involvement of a membrane guanylate cyclase (mGC).
7. The rapid decrease in  $K_{ATP}$  channel activity elicited by  $17\beta$ -oestradiol was greatly reduced using Rp-8-pCPT-cGMPS, a specific blocker of cGMP-dependent protein kinase (PKG). Conversely, Rp-cAMPS, which inhibits cAMP-dependent protein kinase (PKA), had little effect.
8. The results presented here indicate that rapid, non-genomic effects of  $17\beta$ -oestradiol after interaction with its binding site at the plasma membrane of pancreatic  $\beta$ -cells is a cGMP-dependent phosphorylation process.

Oestrogens are lipophilic hormones that classically activate nuclear receptors triggering different genomic effects. In addition to this established mechanism of action, evidence has grown in favour of the non-genomic action of oestrogen via a putative membrane receptor. Non-genomic effects of oestrogen are characterised by their rapid time course: from a few seconds to 2–10 min after oestrogen application. These fast responses are not blocked by cycloheximide or actinomycin-D, which are inhibitors of protein synthesis and DNA transcription, respectively. Non-genomic actions are reproduced by oestrogens bound to macromolecules, such as albumin or peroxidase, which are not able to cross the plasma membrane. These criteria, amongst others, have been used to identify the non-transcriptional action of

oestrogens in both excitable and non-excitable cells (Wehling, 1997; Moss *et al.* 1997; Alonso & López-Coviella, 1998). For instance, non-genomic modulation of calcium signals by steroid hormones has been described in sperm (Blackmore *et al.* 1991), granulosa cells (Morley *et al.* 1992), male osteoblasts (Lieberherr & Grosse, 1994), human vascular endothelial cells (Moini *et al.* 1997), breast cancer and HeLa cells (Impronta-Brears *et al.* 1999), whereas modulation of ion channels has been described in vascular smooth muscle (Zhang *et al.* 1994; Kitazawa *et al.* 1997; Ruehlmann *et al.* 1998), hippocampal neurones (Mermelstain *et al.* 1996) and fibroblasts (Hardy & Valverde, 1994), amongst others.

The regulatory effects described in the above paragraph are likely to be induced via a plasma membrane oestrogen

receptor. Evidence for the existence of oestrogen membrane receptors has been described in several systems (Pappas *et al.* 1995; Ramirez *et al.* 1996; Monje & Boland, 1999; Luconi *et al.* 1999), including pancreatic  $\beta$ -cells (Nadal *et al.* 1998). Recently, a 29 kDa membrane oestrogen receptor has been identified in human sperm. Binding of oestradiol to this receptor elicits calcium influx (Luconi *et al.* 1999). If non-genomic effects of oestrogen are mediated by a membrane oestrogen receptor, the mechanism underlying these effects should be similar to those operating in lipid-insoluble hormone actions. Thus,  $17\beta$ -oestradiol will bind to the receptor, activating enzymatic production of a second messenger, which generally combines with another molecule to produce a metabolically active complex.

There is mounting evidence to suggest that second messengers are involved in the rapid action of oestrogens after interacting with their binding sites at the plasma membrane. For instance, oestradiol induces rapid non-genomic changes of inositol 1,4,5-trisphosphate (Singh & Gupta, 1997; Marino *et al.* 1998) and cyclic nucleotide levels (Farhat *et al.* 1996). Generation of cAMP induced by  $17\beta$ -oestradiol in excitable cells modulates ion channels (Picotto *et al.* 1996) and ionotropic receptors (Gu & Moss, 1996). Likewise, alterations of cGMP levels modulate ion channels promoting vascular relaxation (White *et al.* 1995; Darkow *et al.* 1997).

The endocrine pancreas is not a classical target for oestrogens and little information concerning the effect of oestrogens on this tissue is available. Nonetheless, recent investigations suggest that oestrogens may have an *in vivo* insulinotropic effect (Brussaard *et al.* 1997). Treatment of male and ovariectomized female mice with oestrogens prevents the development of diabetes (Efrat, 1991). Recently, a direct effect of  $17\beta$ -oestradiol upon  $\beta$ -cells has been demonstrated (Nadal *et al.* 1998). Physiological concentrations of  $17\beta$ -oestradiol rapidly (less than 2 min) close  $K_{ATP}$  channels and, in synergy with glucose, regulate calcium signals, potentiating insulin secretion. These effects occur through a membrane binding site, visualised using peroxidase-conjugated oestradiol as a probe. Nevertheless, generation of second messengers involved in the regulation of a  $\beta$ -cell signalling system by  $17\beta$ -oestradiol has yet to be demonstrated.

Modulation of  $Ca^{2+}$  and  $K_{ATP}$  channels is responsible, at least in part, for the acute vasodilatory effect of  $17\beta$ -oestradiol in isolated perfused heart (Hugel *et al.* 1999). The aim of the present study was to identify the second messengers involved in the effect of  $17\beta$ -oestradiol on calcium signals and  $K_{ATP}$  activity in whole islets of Langerhans and isolated pancreatic  $\beta$ -cells. Our data demonstrate that  $17\beta$ -oestradiol increases cGMP but not cAMP levels. cGMP activates PKG which decreases  $K_{ATP}$  channel activity, modulating the calcium signal responsible for insulin secretion. These results extend our knowledge about the role of PKG in the pancreatic  $\beta$ -cell signalling system, which in itself remains unresolved. Furthermore, our findings may

be important in understanding the pathways used by oestrogens to exert their membrane actions and provide additional evidence in favour of the existence of a plasma membrane oestrogen receptor.

## METHODS

### Materials

LY 83583 (6-(phenylamino)-5,8-quinolinedione, 6-anilino-5,8-quinolinedione) was from RBI (Natick, MA, USA). Rp-8-pCPT-cGMPs (TEA salt) was from Alexis Corporation Ltd (Läufelfingen, Switzerland). Indo-1 AM was from Molecular Probes (Leiden, Netherlands). Other materials were from Sigma (Madrid, Spain).

### Islets isolation and intracellular calcium measurement

Swiss albino OF1 male mice (8–10 weeks old) were killed by cervical dislocation in accordance with national guidelines. Pancreatic islets of Langerhans were isolated with collagenase digestion as previously described (Nadal *et al.* 1994) and loaded at room temperature with Indo-1 by incubation for 90 min with the AM ester form (6  $\mu$ M, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). This was added as a concentrated stock solution in dimethyl sulfoxide (final concentration 0.1% v/v). Loaded islets were kept at room temperature in a medium containing (mM): 115 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 5 KCl, 1.1 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub> and 2.5 Hepes; plus 1% albumin, continuously bubbled with a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>; final pH 7.35. Individual islets were left to settle down in the recording chamber for 1–2 min before starting the perfusion. Islets were perfused with a modified Ringer solution containing (mM): 120 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.1 MgCl<sub>2</sub> and 2.5 CaCl<sub>2</sub>; final pH 7.35.

Intracellular calcium was monitored by measuring the fluorescence emitted by the fluorophore Indo-1 (Grynkiewicz *et al.* 1985) using a double emission microfluorescence system. The epifluorescence set up was built on a Nikon-Diaphot inverted microscope. Indo-1 was excited at  $350 \pm 5$  nm by means of a 75 W xenon lamp and a narrow band-pass filter. To prevent ultraviolet damage to cells and photobleaching of the indicator, the intensity of the excitation illumination was attenuated with neutral density filters. The Indo-1 emission fluorescence was split into two beams, which passed through band-pass filters centred at  $410 \pm 5$  and  $480 \pm 5$  nm and was detected by two photomultipliers (Thorn EMI 9924B). Fluorescence emission at 410 and 480 nm and the ratio of both wavelengths were recorded on-line and stored in a computer for further analysis with Axotape (Axon Instruments Inc.). Records are expressed as the ratio of fluorescence at 410 and 480 nm ( $F_{410}/F_{480}$ ).

Bath temperature was maintained at  $35 \pm 1$  °C using a stainless-steel ring heater controlled by a thermostat, which was monitored continuously with a microthermistor.

### Measurement of cAMP and cGMP

Once islets were isolated, they were divided among tubes in groups of 15 islets for cAMP detection and 28–45 islets to measure cGMP. Islets were preincubated for 1 h at 37 °C, in a medium containing (mM): 120 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.1 MgCl<sub>2</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub> and 3 glucose; pH was maintained at 7.35 by gassing with a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. In the particular case of cGMP detection, 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) was added for 30 min before stimulation. Subsequently, stimuli were added followed by 5 or 15 min incubation as appropriate for cAMP and 30 min for cGMP. Due to low levels of cGMP, incubation periods under 30 min gave undetectable changes when stimulated with 11 mM glucose, which was used as a positive control (Laychock *et al.* 1991). DMSO was

used as a vehicle for 17 $\beta$ -oestradiol; final concentration of DMSO was 10<sup>-5</sup>% and the same concentration was added to all experimental samples in order to avoid any possible artefact. At the end of the incubation period, islets were rapidly put on ice to stop the reaction. Tubes were centrifuged for 5 min at 1000 r.p.m. and the supernatant was discarded. The pellet containing the islets was treated with methanol before sonication. Samples were centrifuged at 6000 r.p.m. for 10 min; the pellet was frozen for the Bradford assay in order to detect the protein content. The supernatant was collected and after evaporation of methanol was frozen. Later, aliquots were assayed for cAMP and cGMP using radioimmunoassay (RIA) kits (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain). The acetylation method was chosen in the case of cGMP. In these experiments 10 nM oestradiol was used in order to obtain a maximal increase in cyclic nucleotides. Although this concentration is not considered pharmacological, it is slightly higher than physiological (100 pM–1 nM, used throughout the paper).

Results are expressed as means  $\pm$  s.e.m. Data were analysed for statistical differences using one-way analysis of variance. The number of experiments and *P* values are detailed in figure legends.

#### Cell isolation and culture

Islets from adult (8–10 week old) Swiss albino male mice (OF1), killed by cervical dislocation, were isolated, dispersed into single cells and cultured as previously described (Valdeolmillos *et al.* 1992). Briefly, islets were isolated by collagenase digestion as described above, separated by centrifugation and hand picked under a stereo-

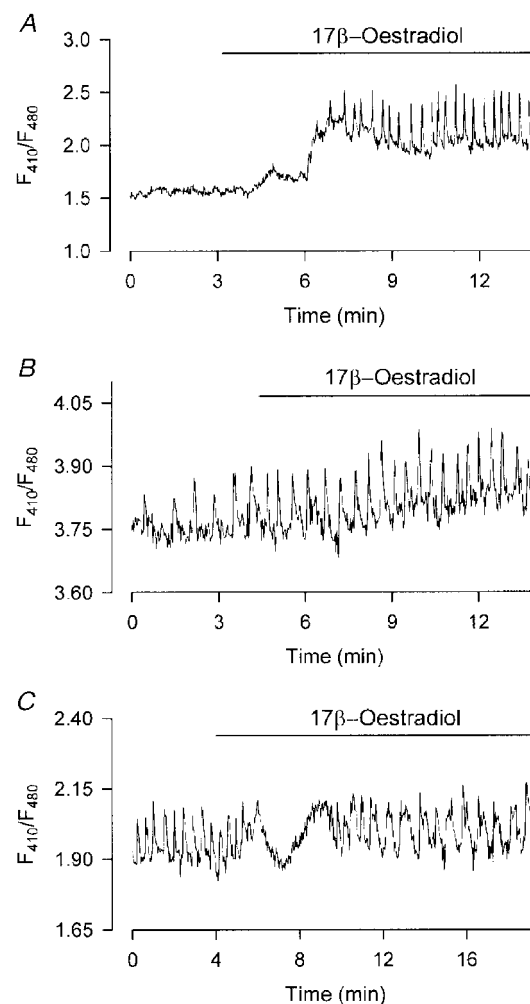
microscope. Once isolated, islets were disaggregated into single cells in a low calcium medium. Cells were then centrifuged, resuspended in culture medium RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 100 units ml<sup>-1</sup> penicillin, 0.1 mg ml<sup>-1</sup> streptomycin and 11 mM glucose, and plated on glass coverslips. Cells were kept at 37 °C, in a humidified atmosphere of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, and used within 1–5 days of culture.

#### Patch-clamp recordings

Single-channel currents were recorded from cell-attached and inside-out membrane patches using standard patch-clamp recording procedures (Hamill *et al.* 1981). Patch pipettes were pulled from Clark Electromedical glass capillaries (Reading, UK) using a two-stage puller (Mecanex BB-CH, Geneva, Switzerland), with resistances of 8–12 M $\Omega$  when filled with the pipette solution. In cell-attached patches the pipette solution contained (mM): 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 Hepes and 1 EGTA (pH 7.2); and the bath solution contained (mM): 5 KCl, 135 NaCl, 10 Hepes, 2.5 CaCl<sub>2</sub> and 1.1 MgCl<sub>2</sub> (pH 7.4). In inside-out experiments, the bath and pipette solutions were exchanged, and bath solution was applied through a RSC-100 rapid solution changer (Biologic, Claix, France).  $K_{ATP}$  channel unitary currents were recorded using an Axopatch 200 amplifier (Axon Instruments Inc.) and stored on a tape recorder (DAT, DTR-1202, Biologic; Claix, France) for subsequent analysis with an in-house programme. Experiments were replayed through an 8-pole Bessel filter (Frequency Devices). The pipette potential was held at 0 mV throughout recording.  $K_{ATP}$  channel activity was quantified by digitising 60 s sections of the current record, filtered

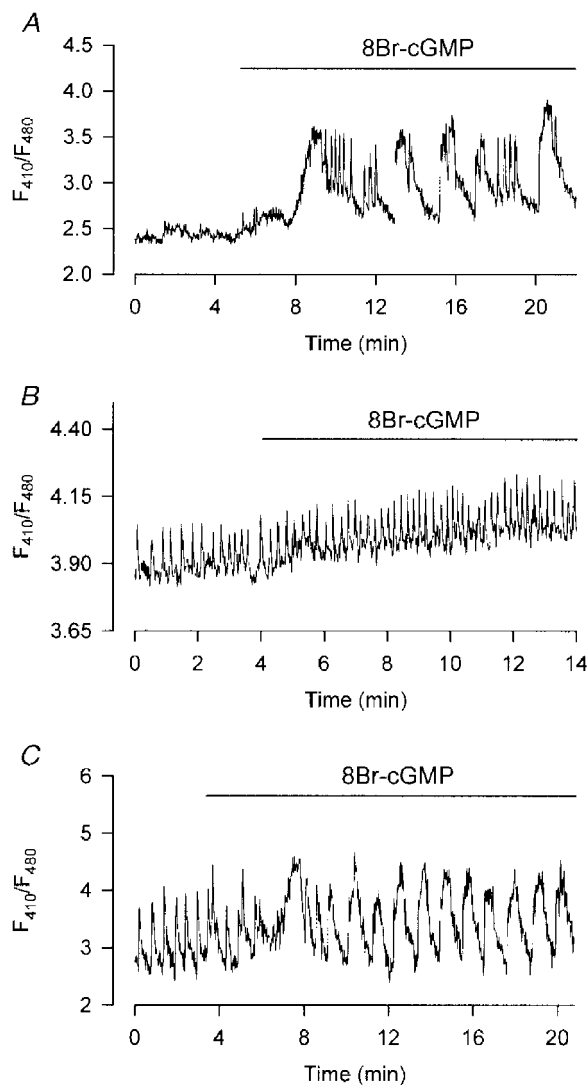
**Figure 1. Effects of 17 $\beta$ -oestradiol on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signals in whole islets of Langerhans**

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses of 3 different islets of Langerhans in the presence of 8 mM glucose to 1 nM 17 $\beta$ -oestradiol applied for the period indicated by the horizontal bar. The Ca<sup>2+</sup>-dependent fluorescence of Indo-1 is expressed as the ratio  $F_{410}/F_{480}$  (see Methods). Four distinct kinds of responses were recorded. *A*, generation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations on a plateau (19%, 10 of 53 islets tested). Increment in the level of  $F_{410}/F_{480}$  in the presence of 17 $\beta$ -oestradiol (plateau) with respect to the basal level ( $\Delta(F_{410}/F_{480})$ ) is  $0.33 \pm 0.09$ . *B*, an increase in the frequency of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations on a plateau level (32%, 17 of 53 islets). The height of the plateau was determined as the difference between the fluorescence levels at the valleys of the oscillations in the presence and absence of 17 $\beta$ -oestradiol. In this case  $\Delta(F_{410}/F_{480}) = 0.3 \pm 0.1$ . *C*, lengthening of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations after a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient (17%, 9 of 53 islets). The plateau was very small in these records ( $\Delta(F_{410}/F_{480}) = 0.07 \pm 0.05$ ). Besides these three oscillatory patterns an irregular oscillatory response was induced in 15% (8 of 53 islets used), and in an additional 17% (9 of 53 islets) 17 $\beta$ -oestradiol was without effect.





at 1 kHz, sampled at 10 kHz by a Digidata 1200, and calculating the mean  $NP_o$  during the sweep. A 70% threshold method was used to detect events. Data sampling was started 1 min before (control) and 7 min after (test) application of test substances in cell-attached experiments, and 1–30 s in excised patches. Channel activity was defined as the product of  $N$ , the number of functional channels, and  $P_o$ , the open-state probability.  $P_o$  was determined by dividing the total time channels spent in the open state by the total sample time. In experiments used to determine PKG implication, due to the high number of active channels, instead of  $NP_o$ , an integral analysis of the current was used to measure channel activity. Unless otherwise indicated, data are expressed as means  $\pm$  s.e.m. For statistical analysis a one-way ANOVA was used. Experiments were performed at room temperature (20–24 °C).



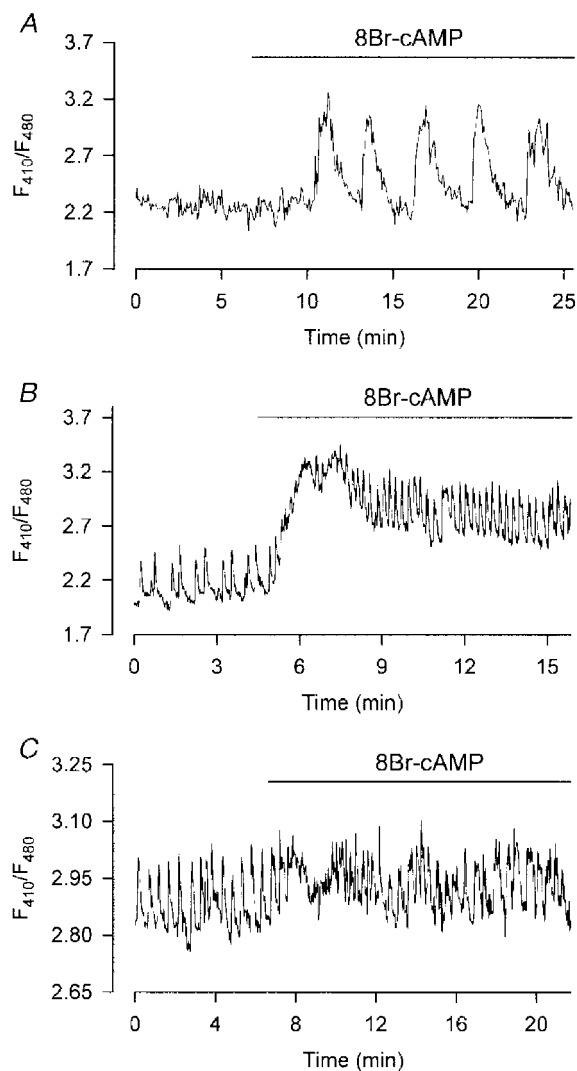
**Figure 2.** cGMP reproduces  $17\beta$ -oestradiol effects on  $[Ca^{2+}]_i$  signals

Different  $[Ca^{2+}]_i$  responses to  $10 \mu M$  8-Br-cGMP (8Br-cGMP) in 3 different islets exposed to 8 mM glucose. *A*, generation of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in non-oscillatory islets compared with basal (25%, 3 of 12 islets used). *B*, increase in the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations to a plateau level (33%, 4 of 12 islets). *C*, lengthening of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations after a  $[Ca^{2+}]_i$  transient (42%, 5 of 12 islets).

## RESULTS

### Basic characteristics of calcium signals in response to $17\beta$ -oestradiol

Application of  $17\beta$ -oestradiol to the islets of Langerhans in the presence of a stimulatory concentration of glucose (8 mM), induced four different types of  $[Ca^{2+}]_i$  response (see Fig. 1). Once a steady  $[Ca^{2+}]_i$  signal in response to 8 mM glucose was established, application of 1 nM  $17\beta$ -oestradiol induced an oscillatory pattern of  $[Ca^{2+}]_i$  on a plateau level in islets that did not show glucose-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations (Fig. 1*A*), an increase in the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations (Fig. 1*B*), or



**Figure 3.** cAMP reproduces  $17\beta$ -oestradiol actions on  $[Ca^{2+}]_i$  signals

Different  $[Ca^{2+}]_i$  responses to  $10 \mu M$  8-Br-cAMP in 3 different islets exposed to 8 mM glucose. *A*, generation of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in islets which did not display  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in response to 8 mM glucose (19%, 3 of 16 islets used). *B*, increase in the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations (44%, 7 of 16 islets). *C*, lengthening of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations after a  $[Ca^{2+}]_i$  transient (31%, 5 of 16 islets). Six per cent, 1 of 16 islets tested, showed an irregular  $[Ca^{2+}]_i$  pattern produced by 8-Br-cAMP.

an increase in the duration of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations (Fig. 1C). A change in the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations, such as those in Fig. 1A and B, were observed in 51% of the islets tested (see figure legend for details). Modifications of the  $[Ca^{2+}]_i$  pattern such as those in Fig. 1C were observed in 17% of the islets and irregular  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations were elicited in 15% of the islets (not shown). The latter were taken as positive responses; however, they were not used for analysis, due to the difficulty in quantifying such an irregular pattern. Finally, 17 $\beta$ -oestradiol applied at 1 nM was without effect in 17% of the islets tested. Oestradiol actions were not reversible within the time course of a perfusion experiment.

#### Cyclic nucleotides mimic 17 $\beta$ -oestradiol effects on $[Ca^{2+}]_i$ signals

To investigate the involvement of cyclic nucleotides in the potentiation of glucose-induced  $[Ca^{2+}]_i$  signals by 17 $\beta$ -oestradiol, 8-Br-cGMP, 8-Br-cAMP and forskolin were tested in the presence of 8 mM glucose. Application of 8-Br-cGMP at concentrations as low as 10  $\mu$ M reproduced the changes elicited by 17 $\beta$ -oestradiol on  $[Ca^{2+}]_i$ . The cGMP analogue elicited  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in non-oscillating islets, which represents 25% of islets tested (Fig. 2A), and an increase in the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in 33% (Fig. 2B). An increase in the duration of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations (Fig. 2C) was also reproduced by 8-Br-cGMP in 42% of the islets.

The permeable analogue of cAMP, 8-Br-cAMP, also reproduced the effects evoked by 17 $\beta$ -oestradiol (Fig. 3). Moreover, when 1  $\mu$ M forskolin, an adenylate cyclase activator, was tested similar effects to 8-Br-cAMP, 8-Br-cGMP and 17 $\beta$ -oestradiol were produced (not shown).

Changes in the frequency and duration of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations elicited by 17 $\beta$ -oestradiol and cyclic nucleotide analogues were very similar as shown in Fig. 4.

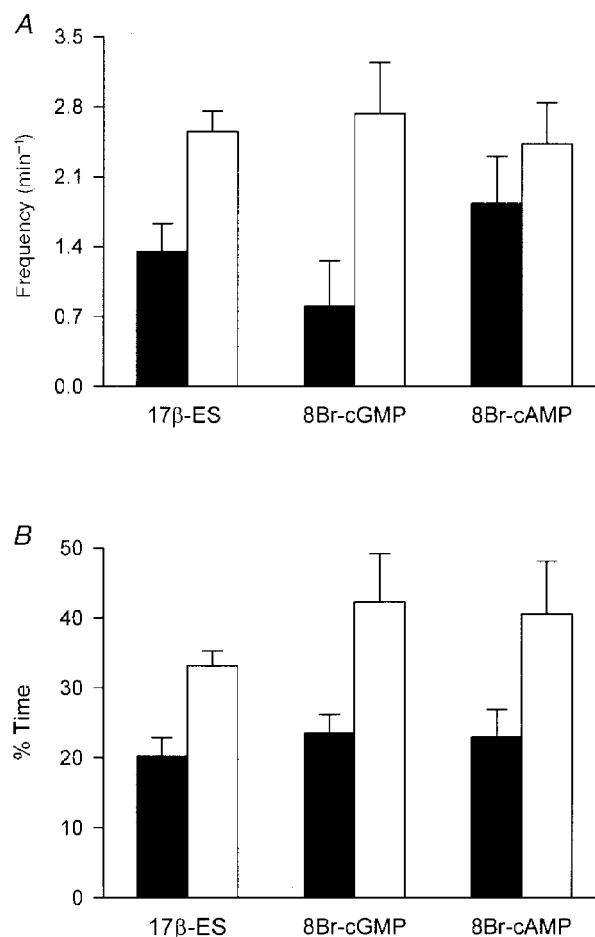
These findings indicate the possibility that both cGMP and cAMP or either of them may be implicated in mediating the effect of 17 $\beta$ -oestradiol on  $[Ca^{2+}]_i$  signals in the islets of Langerhans.

#### 17 $\beta$ -oestradiol raises cGMP but not cAMP levels

In order to elucidate which cyclic nucleotides were involved in the rapid effect evoked by 17 $\beta$ -oestradiol, levels of both cyclic nucleotides were measured in batches of isolated islets of Langerhans. Neither glucose nor 17 $\beta$ -oestradiol modified cAMP levels measured after 15 min of oestradiol application (Fig. 5A). The same result was obtained when islets were stimulated for only 5 min, indicating that rapid production and subsequent degradation by phosphodiesterases is unlikely. On the contrary, when 17 $\beta$ -oestradiol was applied in the presence of 8 mM glucose, cGMP was increased by  $37 \pm 15\%$  compared with that produced by 8 mM glucose alone (Fig. 5B). While this increase is moderate, it is well

**Figure 4. Comparison of  $[Ca^{2+}]_i$  signal properties modified by 17 $\beta$ -oestradiol and cyclic nucleotide analogues**

A, average frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in control conditions (■) and in the presence of the indicated stimuli (□). The frequency of oscillations was calculated in periods of 3–6 min, once the record was stable. The difference was significant between 17 $\beta$ -oestradiol (17 $\beta$ -ES; 1 nM,  $n = 21$  islets) and 8-Br-cGMP (10  $\mu$ M,  $n = 7$  islets,  $P = 0.0003$ ), but not between 17 $\beta$ -oestradiol and 8-Br-cAMP (10  $\mu$ M,  $n = 8$  islets,  $P = 0.1$ ). Student's paired  $t$  test was used, comparing control and stimulus in the same experiment. B, average of the percentage time that calcium is elevated in control conditions (■) and in the presence of stimuli (□). The period that  $Ca^{2+}$  is elevated was calculated measuring the time that  $[Ca^{2+}]_i$  levels remained above the half-peak value. Although the period of time used for analysis was different between records (6–10 min), the same time was utilised for analysing control and stimulus in each particular experiment. Differences between the stimulus and its control were significant in all three cases.  $P = 10^{-5}$  for 17 $\beta$ -ES ( $n = 9$  islets),  $P = 0.05$  for 8-Br-cGMP ( $n = 4$  islets) and  $P = 0.02$  for 8-Br-cAMP ( $n = 5$  islets). Student's paired  $t$  test.



within the range produced when increasing glucose from 8 mM to 11 mM (Fig. 5B). Such differences agree with results previously published on the effect of glucose on cGMP levels (Laychock *et al.* 1991). We can conclude that 17 $\beta$ -oestradiol increases cGMP yet cAMP levels remain unchanged.

### 8-Br-cGMP mimics the effect of 17 $\beta$ -oestradiol on $K_{ATP}$ channel activity

It is known that 17 $\beta$ -oestradiol enhances  $[Ca^{2+}]_i$  signals and insulin secretion regulating  $K_{ATP}$  channel activity (Nadal *et al.* 1998). It has been demonstrated that cAMP analogues decrease  $K_{ATP}$  channel activity in pancreatic  $\beta$ -cells (Holz *et al.* 1993). We conclude that cAMP mimics 17 $\beta$ -oestradiol action on  $K_{ATP}$  channels. However, little is known about the role of cGMP in regulating  $K_{ATP}$  channel activity. To investigate the latter, cell-attached patch recordings were obtained under conditions in which the bathing solution contained no glucose. When 8-Br-cGMP was applied, a substantial decrease in  $K_{ATP}$  channel activity was produced. The reduction in  $K_{ATP}$  channel activity was similar to that achieved with physiological concentrations of 17 $\beta$ -oestradiol (Fig. 6A and B). Both substances produced a fast decrease in the activity of the channel. Figure 6C represents the time course of  $K_{ATP}$  mean open probability ( $NP_o$ ) of records in panels A and B. The time to reach maximum current inhibition in both cases was between 2 and 8 min. When results were pooled, the maximum current inhibition reached

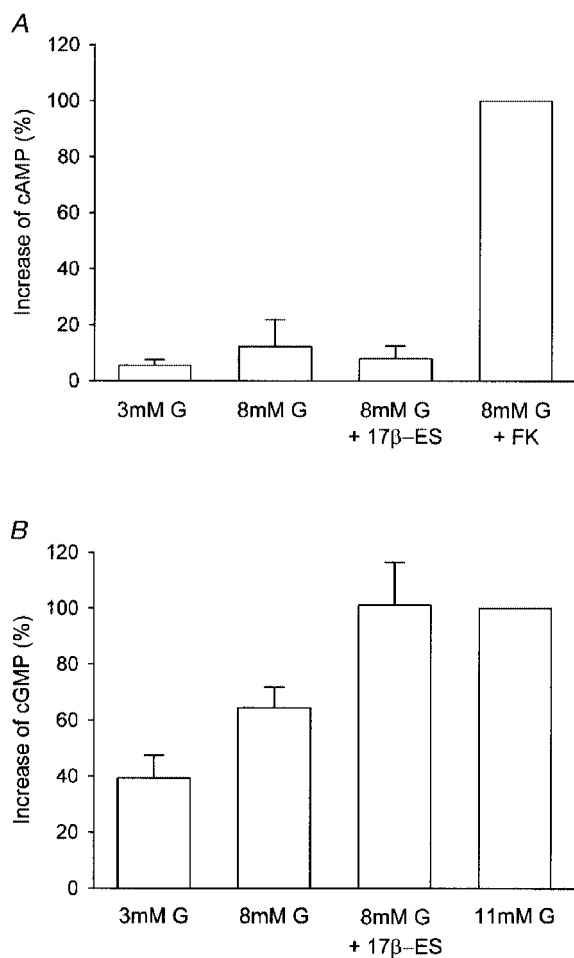
using 8-Br-cGMP was 65% of control. Such an inhibition was 70% of that induced by 100 pM 17 $\beta$ -oestradiol (Fig. 6D).

The increments of cGMP levels are usually generated by activation of either membrane-bound or soluble guanylate cyclase. In order to evaluate such a possibility, LY 83583, a specific inhibitor of soluble guanylate cyclase, was used. This inhibitor was without effect on the 17 $\beta$ -oestradiol-induced decrease of  $K_{ATP}$  activity, indicating that cytoplasmic (soluble) guanylate cyclase (sGC) was not involved in the effect of 17 $\beta$ -oestradiol.

### PKG inhibitors block the effect of 17 $\beta$ -oestradiol on $K_{ATP}$ activity

Results described in the above paragraph show that 8-Br-cGMP mimics the effect of 17 $\beta$ -oestradiol. The action of the analogue may be a direct effect on the channel or an indirect effect via a phosphorylation/dephosphorylation process. However, the experiment described in Fig. 7 excludes a direct effect of cGMP on the channel for when 8-Br-cGMP was applied to the inner surface of an excised membrane patch, no change in the  $K_{ATP}$  channel activity was monitored.

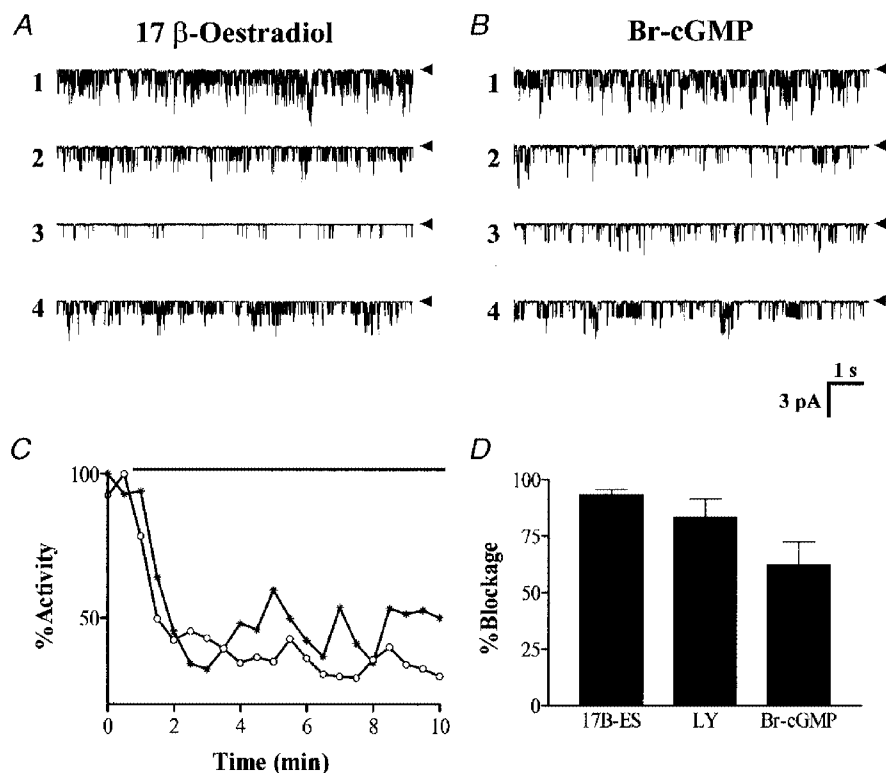
Experiments described in Figs 6 and 7 show that cGMP decreases  $K_{ATP}$  channel activity similarly to 17 $\beta$ -oestradiol. The possibility that cGMP action involves a phosphorylation/dephosphorylation process is examined below.



**Figure 5. Direct measurement of cAMP and cGMP levels**

A, cAMP levels measured by radioimmunoassay at basal levels of glucose (G; 3 mM), stimulatory levels of glucose (8 mM) and 8 mM glucose plus 10 nM 17 $\beta$ -oestradiol, after 15 min stimulation.

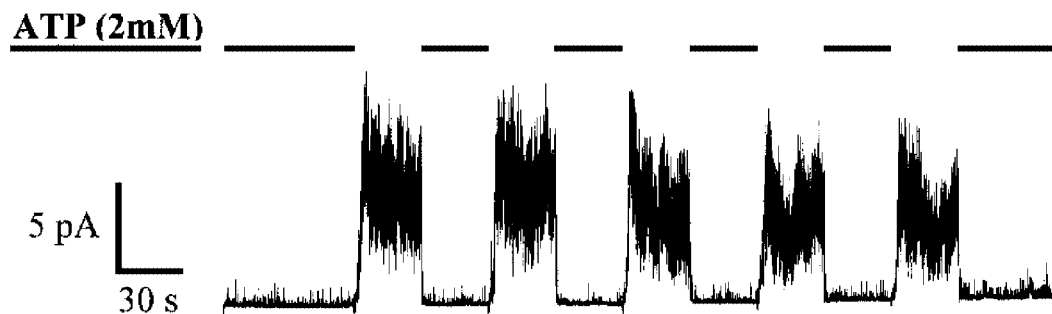
Results are expressed as a percentage of the maximal response obtained with 1  $\mu$ M forskolin (FK). The average value of cAMP when stimulated by forskolin was  $370 \pm 276$  fmol ( $\mu$ g protein) $^{-1}$ . Results are expressed as means  $\pm$  s.e.m. of two different experiments with triplicate samples. B, increment of cGMP levels by glucose and 10 nM 17 $\beta$ -oestradiol. Results are expressed as a percentage of the maximal response obtained with 11 mM glucose. The average value of cGMP induced by 11 mM glucose is  $4.9 \pm 1.9$  fmol ( $\mu$ g protein) $^{-1}$ . Results are expressed as means  $\pm$  s.e.m. from six different experiments with duplicate samples. The difference between values obtained with 8 mM glucose and 8 mM glucose plus 10 nM 17 $\beta$ -oestradiol is considered significant ( $P = 0.05$ ), using one-way ANOVA.



**Figure 6.** Both 17β-oestradiol and 8-Br-cGMP modulate  $K_{ATP}$  channel activity

A, 17β-oestradiol (100 pM) decreased  $K_{ATP}$  channel activity in intact pancreatic islet cells. Single  $K_{ATP}$  currents were recorded from cell-attached patches on cultured islet cells at a 0 mV pipette potential. The record shows  $K_{ATP}$  channel activity before application of 17β-oestradiol, 3 min after application, 7 min after application, and 30 min after washing (traces 1–4, respectively). Arrowheads point to the level where channels are closed. Application of 1 nM 17β-oestradiol gave essentially the same result. B, the same experiment described in A but applying 10 μM 8-Br-cGMP instead of 17β-oestradiol. C, time course of  $K_{ATP}$  channel mean open probability ( $NP_o$ ) of experiments in A and B. ○, the effect of 17β-oestradiol; \*, the effect of 8-Br-cGMP. D, mean of the percentage of blockage of the  $K_{ATP}$  channel activity elicited by 100 pM 17β-oestradiol (17β-ES) ( $n = 7$ ), 100 pM 17β-oestradiol in the presence of either 10 μM LY 83583 or 10 μM 8-Br-cGMP. Soluble guanylate cyclase inhibitor LY 83583 was without effect ( $n = 3$ ,  $P = 0.1$ , one-way ANOVA). 8-Bromo-cGMP reproduced an effect 70% of that elicited by 17β-oestradiol ( $n = 6$ ,  $P = 0.01$ , one-way ANOVA). Cells were preincubated with LY 83583 for 20 min before performing the experiment. Experiments were done in the absence of glucose.

**Br-cGMP 10 μM**



**Figure 7.** Lack of effect of 10 μM 8-Br-cGMP on  $K_{ATP}$  channel activity in inside-out cell membrane patches

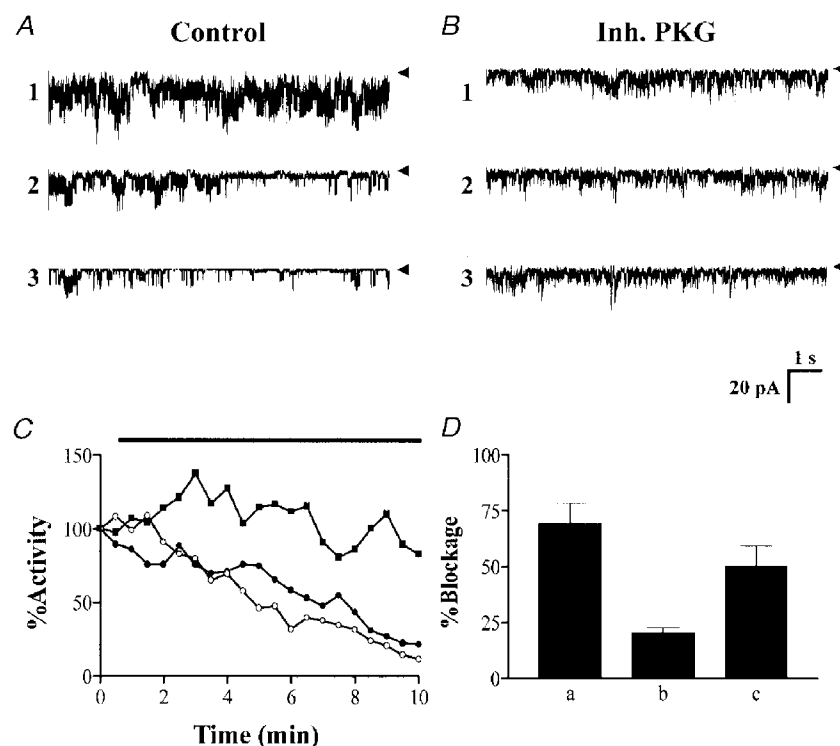
Patch potential was held at 0 mV. 8-Br-cGMP was applied during the period indicated above the record. Complete blockade of channel activity in the presence of 2 mM ATP assured  $K_{ATP}$  channel responsiveness. Experiment is representative of 4 different cells.

In most cellular systems cGMP activates the regulatory subunit of cGMP-dependent protein kinase (PKG). If PKG were involved in  $17\beta$ -oestradiol action then inhibition of the kinase would abolish the oestradiol-induced decrease of  $K_{ATP}$  channel activity. Application of Rp-8-pCPT-cGMPS, a specific competitive inhibitor of PKG, strongly inhibited the decline of  $K_{ATP}$  channel activity elicited by  $17\beta$ -oestradiol (Fig. 8). Reduction of  $K_{ATP}$  channel activity was only  $20 \pm 2\%$  in the presence of the PKG inhibitor, whereas a  $70 \pm 9\%$  reduction of activity was recorded in control experiments performed in  $\beta$ -cells from the same culture. To investigate the role of cAMP, we sought to use Rp-cAMPS, a specific competitive blocker of PKA. When the effect of  $17\beta$ -oestradiol on  $K_{ATP}$  channel activity was analysed, the PKA inhibitor only slightly reduced the action of  $17\beta$ -oestradiol on  $K_{ATP}$  activity (Fig. 8D). These results are consistent with  $17\beta$ -oestradiol modulating  $K_{ATP}$  channels by a PKG-dependent mechanism, though they do not completely exclude a minor participation of PKA.

## DISCUSSION

The experiments reported here indicate that physiological concentrations of  $17\beta$ -oestradiol modulate calcium signals in whole islets of Langerhans. In the majority of cases,  $17\beta$ -oestradiol increases the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  induced by 8 mM glucose. Furthermore,  $17\beta$ -oestradiol triggers  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in islets that were silent in the presence of glucose. The effects of  $17\beta$ -oestradiol are rapid in onset and persist during oestrogen application. It is well known that these effects are non-genomic, partially stereospecific and result in an enhanced insulin secretion (Nadal *et al.* 1998). The effects of  $17\beta$ -oestradiol on calcium signalling are mimicked by concentrations as low as 10  $\mu$ M of 8-Br-cGMP, 8-Br-cAMP and 1  $\mu$ M forskolin.

Since the actions of  $17\beta$ -oestradiol on  $\beta$ -cell signalling system are glucose dependent, the different metabolic states induced by glucose in different islets may explain the marked variability in the  $[Ca^{2+}]_i$  responses. When islets are



**Figure 8.** PKG is involved in  $17\beta$ -oestradiol-induced reduction of  $K_{ATP}$  channel activity

A,  $17\beta$ -oestradiol (100 pM) decreases  $K_{ATP}$  channel activity in intact pancreatic islet cells. Single  $K_{ATP}$  currents were recorded from cell-attached patches on cultured islet cells at a 0 mV pipette potential. The record shows  $K_{ATP}$  channel activity before application of  $17\beta$ -oestradiol, and 3 and 7 min after application (traces 1, 2 and 3, respectively). B, the same experiment described in A, after 15 min incubation with 10  $\mu$ M Rp-8-pCPT-cGMPS. In order to compare this with the effect of  $17\beta$ -oestradiol in the presence and absence of the PKG inhibitor, experiments described in A and B were performed in cells from the same culture. C, time course of  $K_{ATP}$  channel mean open probability ( $NP_o$ ) of the effect of 100 pM  $17\beta$ -oestradiol (○), 100 pM  $17\beta$ -oestradiol in the presence of 10  $\mu$ M Rp-8-pCPT-cGMPS (■) and 100 pM  $17\beta$ -oestradiol in the presence of 10  $\mu$ M Rp-cAMPS (●). D, mean of the percentage of  $K_{ATP}$  channel activity inhibition elicited by 100 pM  $17\beta$ -oestradiol ( $17\beta$ -ES) ( $n = 3$ ) (a), 100 pM  $17\beta$ -oestradiol in the presence of 10  $\mu$ M Rp-8-pCPT-cGMPS (b), and 100 pM  $17\beta$ -oestradiol in the presence of 10  $\mu$ M Rp-cAMPS (c). In the presence of the PKG inhibitor Rp-8-pCPT-cGMPS, the  $17\beta$ -oestradiol effect was reduced by 80% ( $n = 3$ ,  $P = 0.006$ , one-way ANOVA). Contrary to this, the PKA inhibitor Rp-cAMPS did not significantly affect  $17\beta$ -oestradiol action on  $K_{ATP}$  channel activity ( $n = 3$ ,  $P = 0.2$ , one-way ANOVA).

exposed to nanomolar concentrations of 17 $\beta$ -oestradiol, direct measurement of cyclic nucleotide levels in isolated islets shows an increment in cGMP, whereas cAMP concentrations are unchanged. The increment in cGMP levels is modest, but is nonetheless equivalent to that produced when stimulating with 11 mM glucose (Laychock *et al.* 1991, and present paper). It has already been demonstrated that 17 $\beta$ -oestradiol decreases  $K_{ATP}$  channel activity in a rapid manner: initiation of 17 $\beta$ -oestradiol effect occurs between 30 s and 2 min after oestrogen application (Nadal *et al.* 1998). This time course of action is similar to that found in other studies (Hardy & Valverde, 1994; Gu & Moss, 1996). The decline in channel activity is mimicked by 8-Br-cGMP, when measured in the cell-attached mode. Remarkably, the concentration of 8-Br-cGMP needed to produce an effect, both on  $[Ca^{2+}]_i$  and  $K_{ATP}$  activity, is at least an order of magnitude lower than in most of the studies published. Since the action of cGMP seems to be very potent, a small increase in cGMP levels such as that detected in Fig. 5B, would be enough to account for 17 $\beta$ -oestradiol actions on the  $\beta$ -cell signalling system.

The modulation of  $K_{ATP}$  channel activity by cGMP discussed above could be accomplished via two different pathways: direct interaction of cGMP with the channel or activation of a cGMP-dependent protein kinase responsible for  $K_{ATP}$  channel phosphorylation. The former possibility is invalidated by the experiment shown in Fig. 7, since 8-Br-cGMP was without effect when applied to inside-out patches. By contrast, the oestrogen-induced decrease in channel activity is greatly reduced by a specific blocker of PKG (Rp-8-pCPT-cGMPS). Implication of PKA is minor since Rp-cAMPS, a blocker of PKA, has a very small effect.

Both PKA and PKG exist in pancreatic  $\beta$ -cells. The former is involved in a multitude of signalling processes, whereas the role of the latter is still unclear (see Jones & Persaud, 1998, for a review). Implication of PKG in 17 $\beta$ -oestradiol action is therefore a new finding for pancreatic  $\beta$ -cell signalling. Since PKG activity influences apoptotic cell death in  $\beta$ -cells (Loweth *et al.* 1997), 17 $\beta$ -oestradiol may also influence  $\beta$ -cell survival, which may be of therapeutic importance.

In summary, the modulation of calcium signals by 17 $\beta$ -oestradiol is due to a blockage of  $K_{ATP}$  channels, inducing depolarisation of the membrane and an enhanced calcium influx. Modulation of  $K_{ATP}$  channels appears to be mediated by an increase in cGMP levels, which will activate a cGMP-dependent protein kinase causing  $K_{ATP}$  channel phosphorylation. A minor participation of cAMP in this process cannot be completely ruled out, although an involvement of cGMP is clear.

The actions of 17 $\beta$ -oestradiol resemble those described for other modulators such as glucagon-like peptide (GLP)-1 via cAMP (Holz *et al.* 1993) and atrial natriuretic peptide via cyclic nucleotides (Lee & Laychock, 1997).

Although a direct binding of 17 $\beta$ -oestradiol on maxi-K<sup>+</sup> channels has been described in vascular smooth muscle (Valverde *et al.* 1999), most non-genomic actions of oestrogen, such as those described in  $\beta$ -cells (Nadal *et al.* 1998, and present paper), are likely to be mediated by a plasma membrane receptor. The molecular characteristics of the membrane oestrogen receptor remain little known. A recent study has identified a novel functional membrane oestrogen receptor in human sperm (Luconi *et al.* 1999). Specific binding sites for oestradiol at the plasma membrane have been demonstrated in several types of cells (Pappas *et al.* 1995; Ramirez *et al.* 1996; Nadal *et al.* 1998; Monje & Boland, 1999). Binding of 17 $\beta$ -oestradiol to a hypothetical oestrogen membrane receptor has been shown to alter cyclic nucleotide levels. Increases in cAMP elicited by 17 $\beta$ -oestradiol are usual in excitable cells. For instance, 17 $\beta$ -oestradiol potentiates kainate-induced currents via cAMP (Gu & Moss, 1996), independently of intracellular oestrogen receptors (Gu *et al.* 1999).

cGMP is also involved in rapid oestrogen actions, principally in endothelial cells. In this report we found that changes in cGMP levels are more important than increases in cAMP. An increment in cGMP levels could be mediated via activation of a sGC activated by NO. Rapid, non-genomic stimulation of NO by 17 $\beta$ -oestradiol has been described in endothelial cells (Prevot *et al.* 1999). Although sGC was present in  $\beta$ -cells, it seems unlikely that it could play an important role in 17 $\beta$ -oestradiol generation of cGMP. The last conclusion is based on the experiment described in Fig. 6D. An inhibitor of soluble guanylate cyclase (LY 83583) did not modify the effect of 17 $\beta$ -oestradiol on  $K_{ATP}$  channel activity in cell-attached patches. On the contrary, LY 83583 is known to inhibit NO induced smooth muscle relaxation (Kawada *et al.* 1994). We can further rule out mediation of NO in the response of  $\beta$ -cells to 17 $\beta$ -oestradiol, because NO activates  $K_{ATP}$  channels evoking a decrease of insulin secretion (Tsuura *et al.* 1994). Thus, the effect of NO is opposite to that of 17 $\beta$ -oestradiol on  $K_{ATP}$  channel and insulin secretion (Nadal *et al.* 1998).

The most likely pathway for explaining cGMP augmentation is via a membrane guanylate cyclase (mGC), activated after interaction of 17 $\beta$ -oestradiol with its binding site at the membrane. We cannot exclude a direct effect of 17 $\beta$ -oestradiol on mGC, since biochemical experiments have illustrated that 17 $\beta$ -oestradiol can directly activate membrane guanylate cyclase by an unknown mechanism in PC12 cells (Chen *et al.* 1998). However, this is unlikely since effects of 17 $\beta$ -oestradiol on  $[Ca^{2+}]_i$  and  $K_{ATP}$  channels have a typical profile of a receptor-mediated process (Nadal *et al.* 1998).

In conclusion, the present work demonstrates that physiological levels of 17 $\beta$ -oestradiol decrease  $K_{ATP}$  channel activity, modulating calcium signals. This modulation is a cGMP-dependent phosphorylation process and is likely to

occur after binding of  $17\beta$ -oestradiol to a plasma membrane receptor, activating a membrane guanylate cyclase.

Existence of a second messenger involved in the rapid, nongenomic effect of  $17\beta$ -oestradiol is important evidence for the presence of a plasma membrane oestrogen receptor.

- ALONSO, R. & LÓPEZ-COVIELLA, I. (1998). Gonadal steroids and neuronal function. *Neurochemistry Research* **23**, 679–692.
- BLACKMORE, P. F., NEULEN, J., LATTANZIO, F. & BEEBE, S. J. (1991). Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 18655–18659.
- BRUSSAARD, H. E., GEVERS LEUVEN, J. A., FRÖLICH, M., KLUFT, C. & KRANS, H. M. J. (1997). Short-term oestrogen replacement therapy improves insulin resistance, lipids and fibrinolysis in postmenopausal women with NIDDM. *Diabetologia* **40**, 843–849.
- CHEN, Z.-J., YU, L. & CHANG, C.-H. (1998). Stimulation of membrane-bound guanylate cyclase activity by  $17\beta$ -estradiol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **252**, 639–642.
- DARKOW, D. J., LU, L. & WHITE, R. E. (1997). Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *American Journal of Physiology* **272**, H2765–2773.
- EFRAT, S. (1991). Sexual dimorphism of pancreatic beta-cell degeneration in transgenic mice expressing an insulin-ras hybrid gene. *Endocrinology* **128**, 897–901.
- FARHAT, M. Y., ABI-YOUNES, S. & RAMWELL, P. W. (1996). Nongenomic effects of oestrogen and the vessel wall. *Biochemical Pharmacology* **51**, 571–576.
- GRYNKIEWICZ, G. M., POENIE, M. & TSIEN, R. Y. (1985). A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 3440–3450.
- GU, Q., KORACH, K. S. & MOSS, R. L. (1999). Rapid action of  $17\beta$ -estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. *Endocrinology* **140**, 660–666.
- GU, Q. & MOSS, R. L. (1996).  $17\beta$ -estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *Journal of Neuroscience* **16**, 3620–3629.
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & SIGWORTH, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* **391**, 85–100.
- HARDY, S. P. & VALVERDE, M. A. (1994). Novel plasma membrane action estrogen and antiestrogens revealed by their regulation of a large conductance chloride channel. *FASEB Journal* **8**, 760–765.
- HOLZ, G. G. IV, KÜHTREIBER, W. H. & HABENER, J. F. (1993). Pancreatic  $\beta$ -cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7–37). *Nature* **361**, 362–365.
- HUGEL, S., NEUBAUER, S., LIE, S. Z., ERNST, R., HORN, M., SCHMIDT, H. H., ALLOLIO, B. & REINCKE, M. (1999). Multiple mechanisms are involved in the acute vasodilatory effect of  $17\beta$ -estradiol in the isolated perfused rat heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **33**, 852–858.
- IMPRONTA-BREARS, T., WHORTON, A. R., CODAZZI, F., YORK, J. D., MEYER, T. & McDONNELL, D. P. (1999). Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**, 4686–4691.
- JONES, P. & PERSAUD, S. (1998). Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocrine Reviews* **19**, 429–461.
- KAWADA, T., ISHIBASHI, T., SASAGE, H., KATO, K. & IMAI, S. (1994). Modification by LY 83583 and methylene blue of relaxation induced by nitric oxide, glyceryl trinitrate, sodium nitroprusside and atriopeptin in aortae of the rat, guinea-pig and rabbit. *General Pharmacology* **25**, 1361–1371.
- KITAZAWA, T., HAMADA, E., KITAZAWA, K. & GAZNABI, A. K. M. (1997). Nongenomic mechanism of  $17\beta$ -oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *Journal of Physiology* **499**, 497–511.
- LAYCHOCK, S. G., MODICA, M. E. & CAVANAUGH, C. T. (1991). L-arginine stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine: nitric oxide synthase. *Endocrinology* **129**, 3043–3052.
- LEE, B. & LAYCHOCK, S. G. (1997). Atrial natriuretic peptide and cyclic nucleotides affect glucose-induced  $Ca^{2+}$  responses in single pancreatic islet beta-cells: correlation with  $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase activity. *Diabetes* **46**, 1312–1318.
- LIEBERHERR, M. & GROSSE, B. (1994). Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via pertussis toxin-sensitive G-protein. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 7217–7223.
- LOWETH, A. C., WILLIAMS, G. T., SCARPELLO, J. H. B. & MORGAN, N. G. (1997). Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic  $\beta$  cell line HIT-T15. *FEBS Letters* **400**, 285–288.
- LUCONI, M., MURATONI, M., FORTI, G. & BALDI, E. (1999). Identification of a novel functional oestrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84**, 1670–1678.
- MARINO, M., PALLOTTINI, V. & TRENTALANCE, A. (1998). Estrogens cause rapid activation of  $IP_3$ -PKC- $\alpha$  signal transduction pathway in HEPG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **245**, 254–258.
- MERMELSTAIN, P. G., BECKER, J. B. & SURMEIER, D. J. (1996). Estradiol reduces calcium currents in neostriatal neurons via a membrane receptor. *Journal of Neuroscience* **16**, 595–604.
- MOINI, H., BILSEL, S., BEKDEMIR, T. & EMERK, K. (1997).  $17\beta$ -Estradiol increases intracellular free calcium concentrations of human vascular endothelial cells and modulates its responses to acetylcholine. *Endothelium* **5**, 11–19.
- MONJE, P. & BOLAND, R. (1999). Characterisation of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus. *Molecular Cell Endocrinology* **147**, 75–84.
- MORLEY, P., WHITHFIELD, J. F., VANDERHYDEN, B. C., TSANG, B. K. & SCHWARTZ, J. L. (1992). A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* **131**, 1505–1512.
- MOSS, R. L., GU, Q. & WONG, M. (1997). Estrogen: non-transcriptional signaling pathway. *Recent Progress in Hormone Research* **52**, 33–69.
- NADAL, A., ROVIRA, J. M., LARIBI, O., LEÓN-QUINTO, T., ANDREU, E., RIPOLL, C. & SORIA, B. (1998). Rapid insulinotropic effect of  $17\beta$ -estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB Journal* **12**, 1341–1348.
- NADAL, A., VALDEOLMILLOS, M. & SORIA, B. (1994). Metabolic regulation of intracellular calcium concentration in mouse pancreatic islets of Langerhans. *American Journal of Physiology* **267**, E769–774.
- PAPPAS, T. C., GAMETCHU, B. & WATSON, C. S. (1995). Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labelling and impeded-ligand binding. *FASEB Journal* **9**, 404–410.

- PICOTTO, G., MASSHEIMER, V. & BOLAND, R. (1996). Acute stimulation of intestinal cell calcium influx induced by 17 $\beta$ -estradiol via the cAMP messenger system. *Molecular Cell Endocrinology* **119**, 129–134.
- PREVOT, V., CROIX, D., RIALAS, C. M., POULAIN, P., FRICCHIONE, G. L., STEFANO, G. B. & BEAUVILLAIN, J. C. (1999). Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology* **140**, 652–659.
- RAMIREZ, V. D., ZHENG, J. & SIDDIQUE, K. M. (1996). Membrane receptors for estrogen, progesterone, and testosterone in the rat brain: fantasy or reality. *Cellular and Molecular Neurobiology* **16**, 175–198.
- RUEHLMANN, D. O., STEINERT, J. R., VALVERDE, M. A., JACOB, R. & MANN, G. E. (1998). Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type  $Ca^{2+}$  channels in smooth muscle cells. *FASEB Journal* **12**, 613–619.
- SINGH, S. & GUPTA, P. D. (1997). Induction of phosphoinositide-mediated signal transduction pathway by 17 $\beta$ -oestradiol in rat vaginal epithelial cells. *Journal of Molecular Endocrinology* **19**, 249–257.
- TSUURA, Y., ISHIDA, H., HAYASHI, S., SAKAMOTO, K., HORIE, M. & SEINO, Y. (1994). Nitric oxide opens ATP-dependent  $K^{+}$  channels through suppression of phosphofruktokinase activity and inhibits glucose-induced insulin release in pancreatic  $\beta$  cells. *Journal of General Physiology* **104**, 1079–1099.
- VALDEOLMILLOS, M., NADAL, A., CONTRERAS, D. & SORIA, B. (1992). The relationship between glucose-induced  $K_{ATP}$  channel closure and the rise in  $[Ca^{2+}]_i$  in single mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Journal of Physiology* **455**, 173–186.
- VALVERDE, M. A., ROJAS, P., AMIGO, J., COSMELLI, D., ORIO, P., BAHAMONDE, M. I., MANN, G. E., VERGARA, C. & LATORRE, R. (1999). Acute activation of maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the  $\beta$  subunit. *Science* **285**, 1929–1931.
- WEHLING, M. (1997). Specific non-genomic actions of steroid hormones. *Annual Review of Physiology* **59**, 365–393.
- WHITE, R. E., DARKOW, D. J. & LANG, J. L. (1995). Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circulation Research* **77**, 936–942.
- ZHANG, F., RAM, J. L., STANDLEY, P. R. & SOWERS, J. R. (1994). 17- $\beta$  estradiol attenuates voltage-dependent  $Ca^{2+}$  currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *American Journal of Physiology* **266**, C975–980.

### Acknowledgements

The authors thank Dr Miguel A. Valverde for introducing us to non-genomic effects of oestrogens, Dr Ruth Shepherd for carefully reading the manuscript and E. Pérez García, R. García Velasco and A. Pérez Vegara for technical assistance. This work was supported by the European Commission, Ministerio de Educación y Cultura PM-98-0105, Fondos FEDER. J.M.R. is a recipient of a research studentship from Generalitat Valenciana and A.B.R. from the Ministerio de Educación y Cultura.

### Corresponding author

A. Nadal: Institute of Bioengineering and Department of Physiology, School of Medicine, Miguel Hernández University, San Juan Campus, Carretera Alicante-Valencia Km 87. 03550, Alicante, Spain.

Email: nadal@umh.es



## **ANEXO II**

# Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor $\alpha$ and estrogen receptor $\beta$

Angel Nadal\*<sup>†</sup>, Ana B. Ropero\*, Ouahiba Laribi\*, Marjorie Maillet\*, Esther Fuentes\*<sup>‡</sup>, and Bernat Soria\*

\*Institute of Bioengineering, Department of Physiology, and <sup>†</sup>Department of Applied Biology, Miguel Hernández University, San Juan Campus, Alicante 03550, Spain

Edited by Ramon Latorre, Center for Scientific Studies of Santiago, Valdivia, Chile, and approved August 18, 2000 (received for review June 22, 2000)

**The molecular mechanism used by environmental chemicals to exert their hormone-like actions is still only partially resolved. Although it generally is accepted that xenoestrogens act at the genomic level by binding to intracellular estrogen receptors, we have shown here that they trigger nongenomic effects in pancreatic  $\beta$  cells. Both xenoestrogens and the circulating hormone, 17 $\beta$ -estradiol, bind with high affinity to a common membrane binding site unrelated to the intracellular estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ . This binding site is shared by dopamine, epinephrine, and norepinephrine and has the pharmacological profile of the  $\gamma$ -adrenergic receptor. This study provides an outline of the membrane receptor involved in rapid xenoestrogen actions.**

pancreatic  $\beta$  cells | confocal microscopy | intracellular calcium | cell signaling

Xenoestrogens are compounds that present estrogenic effects but whose chemical structure does not necessarily resemble that of steroid hormones. They are found in fresh water and are likely responsible for the feminization of male fish in several rivers of the United Kingdom and the decreased reproduction success of alligators and turtles in Lake Apopka in Florida (1, 2). These manmade chemicals enter the body by ingestion or adsorption and mimic the genomic actions of estrogens (3) via intracellular estrogen receptors (4–6).

Less attention has been paid to nongenomic actions of xenoestrogens. Several studies have described that xenoestrogens mimic 17 $\beta$ -estradiol when they act on Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells (7) as well as when they trigger prolactin release from rat pituitary tumor cells (8). Yet, a direct link between an estrogen membrane binding site (9) and xenoestrogen actions is still a matter of debate. Moreover, despite the great number of studies about nongenomic actions of estrogens, a clear outline of the membrane receptor involved is still elusive.

We have chosen three widely used xenoestrogens for our study: bisphenol-A (BPA), which is found in the content of canned food, dental sealants, and composites; diethylstilbestrol (DES), a synthetic estrogen used between the 1940s and the 1970s to prevent miscarriages; and the well-known pesticide 1,1,1-trichloro-2-[*o*-chlorophenyl]-2-[*p*-chlorophenyl]ethane (*o,p'*-DDT) (3, 10–12). We have focused our research on the effect of these agents on the signaling system of pancreatic  $\beta$  cells, which are fundamental for the endocrine pancreas function.  $\beta$  cells, which are situated within the islet of Langerhans, are responsible for insulin secretion after an increase of blood glucose. A dysfunction of this particular type of cells causes the widespread pathology diabetes mellitus. An estrogen binding site at the plasma membrane of pancreatic  $\beta$  cells has been described (13). Once 17 $\beta$ -estradiol binds to this site, cGMP increases, activating protein kinase G, which phosphorylates ATP-dependent potassium channels (K<sub>ATP</sub>), depolarizing the plasma membrane, and enhancing intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) signals. As a consequence, insulin secretion is increased (13, 14).

Here, we show that acute nongenomic actions induced by 17 $\beta$ -estradiol and xenoestrogens in pancreatic  $\beta$  cells occur after these substances are bound at a common membrane binding site. This is unrelated to the cytosolic/nuclear estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  and has the pharmacological profile of the so-called “ $\gamma$ -adrenergic receptor.”

## Methods

**Measuring Intracellular Calcium in  $\beta$  Cells Within Intact Islets of Langerhans.** Swiss albino OF1 male mice were killed by cervical dislocation. Pancreatic islets of Langerhans were isolated from mice by using collagenase as described (15). After isolation islets were loaded by incubation in 5  $\mu$ M Fluo-3 AM (Molecular Probes) for at least 1 h at room temperature before imaging intracellular calcium. Calcium records in individual cells were obtained by imaging intracellular calcium under a Zeiss LSM 510 confocal microscope with a Zeiss  $\times$ 40 oil immersion lens, numerical aperture 1.3. Images were collected at 2-s intervals, and fluorescence signals from individual cells were measured as a function of time by using the Zeiss LSM 510 software package. Experiments were performed at 34°C. Results were plotted by using commercially available software (SIGMAPLOT, Jandel Scientific, San Rafael, CA) as the change in fluorescence intensity ( $\Delta F$ ) expressed as a percentage of the basal fluorescence intensity ( $F_0$ ) observed in the absence of stimulus.  $\beta$  cells within the islets were identified by their [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> pattern in 3 mM and 8 mM glucose (16, 17).

**Assay for Estradiol-Peroxidase Binding.** Islets were dispersed into single cells and cultured as described (18). Cells cultured on polylysine-coated coverslips for 24 h were fixed in 4% (wt/vol) paraformaldehyde for 30 s and exposed overnight to 4.5  $\mu$ g/ml estradiol-peroxidase (Sigma) at 4°C. Cells then were washed, and estradiol-peroxidase conjugate [E-horseradish peroxidase (HRP)] binding was developed by using 0.5 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride in the presence of 0.3 mg/ml urea hydrogen peroxide in 0.05 M Tris buffer and 0.15 M NaCl for 30 min (Sigma FAST DAB tablet set). In experiments performed for Fig. 5, 0.2 mg/ml Cl<sub>2</sub>Co was added (Sigma FAST DAB tetrahydrochloride with metal enhancer tablet set)

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: ER $\alpha$ , estrogen receptor  $\alpha$ ; ER $\beta$ , estrogen receptor  $\beta$ ; DES, diethylstilbestrol; BPA, bisphenol-A; *o,p'*-DDT, 1,1,1-trichloro-2-[*o*-chlorophenyl]-2-[*p*-chlorophenyl]ethane; E-HRP, estradiol-horseradish peroxidase; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; NE, norepinephrine; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration.

<sup>†</sup>To whom reprint requests should be addressed at: Institute of Bioengineering and Department of Physiology, School of Medicine, Miguel Hernández University, San Juan Campus, Carretera Alicante-Valencia Km 87, 03550, Alicante, Spain. E-mail: nadal@umh.es.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

to produce the complex Co-DAB, which gives a higher contrast compared with DAB polymers generated in the absence of metal additives. To test that the plasma membrane was not permeabilized, cells were incubated with 2.5 mg/ml dextran-conjugated tetramethylrhodamine (40,000 Da) and immediately visualized by using a Zeiss LSM 510 confocal microscope as described (13).

Because 65–80% of the islet cells are  $\beta$  cells, 15% are  $\alpha$  cells, which can be easily identified by their particular morphology (17), we conclude that between 80% and 95% of the cells we used should be  $\beta$  cells. Nonetheless, we may overestimate the number of  $\beta$  cells by 5–20%.

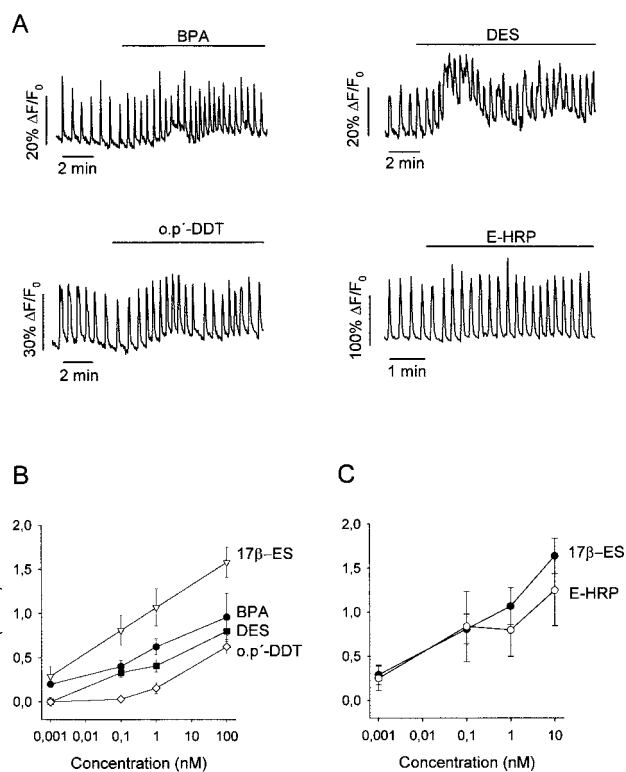
**Binding Studies Using E-HRP.** DAB-based primary reaction products of peroxidase are yellow-brown (DAB) or dark blue (Co-DAB complex); these compounds are highly absorptive for laser light at 488 nm. The absorbed light was used as an indication of the amount of E-HRP bound to the membrane, therefore it is possible to numerically assess binding of E-HRP by analyzing the light absorbed by the polymer formed by DAB or Co-DAB. Nonetheless, quantifying the amount of precipitate simply by measuring the light absorbed may be an unreliable procedure if differences of absorbed light are small. This method is of interest for comparative purposes, and it works extremely well for conditions in which the difference in the amount of precipitate is large. For that reason detailed concentration-response profiles have been omitted. Absorbed light was measured by taking transmission photographs with a Zeiss LSM 510 laser scanning confocal microscope, and the intensity of light along a line through the cell was quantified (see Fig. 2) by using the Zeiss LSM 510 software. Background light and microscope settings were constant throughout different experiments. To obtain an appropriate staining background, HRP was not conjugated to estradiol. When incubation and developmental procedure with HRP were performed in identical condition of experiments, a background absorbed light of  $29 \pm 7\%$  ( $n = 150$  cells from three different coverslips) was obtained (see Fig. 2D). This background light has not been subtracted.

**Immunocytochemistry.** Anti-ER $\alpha$  mAbs H222 and H226 and the affinity-purified peptide antibody ER21 were a kind gift of Geoffrey Greene, University of Chicago (19–22). Anti-ER $\alpha$  rabbit polyclonal antibodies G-20 and MC-20 and anti-ER $\beta$  goat polyclonal antibodies L-20 and Y-19 were from Santa Cruz Biotechnology. Cells cultured on polylysine-coated coverslips for 24 h were fixed in 4% (wt/vol) paraformaldehyde for 30 s and then incubated 30 min with 1% albumin supplemented with 2% fetal goat serum or normal donkey serum. After rinsing with PBS, cells were incubated with the corresponding antibodies (1:100 dilution) for 2 h at room temperature. After washing, FITC-conjugated secondary antibodies anti-mouse/anti-rabbit/anti-goat (1:100 dilution) were applied for 1 h at room temperature to visualize staining. To visualize intracellular labeling, cells were permeabilized after fixation with 1% Triton X-100 for 2 min; the rest of the protocol was followed as above. Confocal scanning laser microscopy was performed with a Zeiss LSM 510 microscope. The specificity of the labeling techniques was proven by the absence of labeling when either the first or the second antibodies were omitted.

**Impeded Ligand Binding Assay.** Once cells were fixed as described above, they were incubated with antibodies G20, H222, Y19, and L20 for 2 h at 4°C. After that, an E-HRP binding assay was performed.

## Results

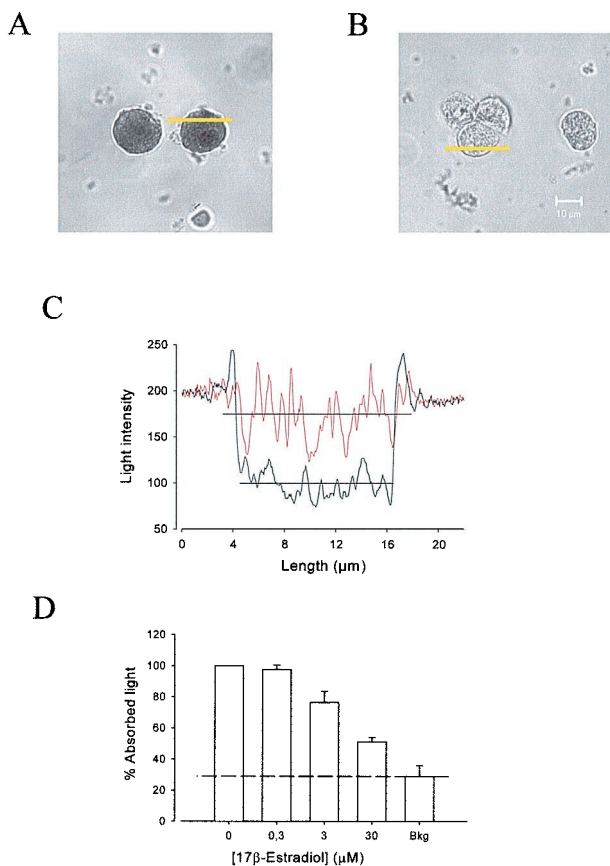
**Responses of  $\beta$  Cell  $[Ca^{2+}]_i$  to Xenoestrogens.** To investigate the role of xenoestrogens in pancreatic  $\beta$  cells,  $[Ca^{2+}]_i$  recordings were



**Fig. 1.** Xenoestrogens mimic 17 $\beta$ -estradiol in modulating  $[Ca^{2+}]_i$ . (A) Change in fluorescence intensity of Fluo-3 in single pancreatic  $\beta$  cells within intact islets of Langerhans. Islets were perfused with 8 mM glucose, and 1 nM BPA (Sigma), DES (Sigma), o,p'-DDT (Chem Service, Chester, Pa), and E-HRP (Sigma) were applied during the bar. The effects were not reversible after 20 min. Records are representative of at least five different experiments. (B) Change in the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations as a function of the concentration of 17 $\beta$ -estradiol (17 $\beta$ -ES), BPA, DES, and o,p'-DDT. Each point is the mean of at least five different experiments. The analysis of the frequency was done during 2- to 4-min periods, always taken when a steady state was reached, usually 4–8 min after stimuli application. Error bars shown are mean  $\pm$  SEM. (C) Change in the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations as a function of the concentration of 17 $\beta$ -estradiol and E-HRP. Each point is the mean of at least three different experiments. The analysis of the frequency was done as described above.

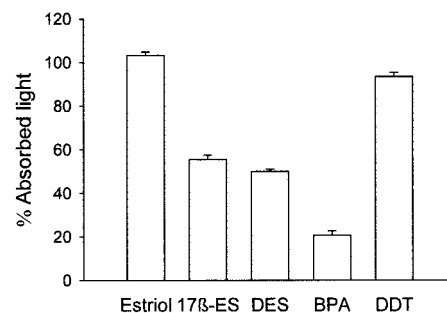
obtained from  $\beta$  cells within intact islets of Langerhans from male mice, using laser scanning confocal microscopy. When 1 nM of BPA and DES was applied in the presence of 8 mM glucose, an increase in the frequency of glucose-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations was observed (Fig. 1A). Both BPA and DES mimicked the effect of 17 $\beta$ -estradiol on  $[Ca^{2+}]_i$  signaling within a similar concentration range (Fig. 1B). In contrast, the effect of o,p'-DDT was milder, and alterations of the  $[Ca^{2+}]_i$  signals were not triggered until 100 nM o,p'-DDT was applied (Fig. 1B). These xenoestrogens, as well as 17 $\beta$ -estradiol (13), were without effect in the absence of glucose. These acute effects should be nongenomic because they were triggered in less than 3 min and were reproduced by the membrane-impermeable E-HRP (Fig. 1A and C). The latter will be used as a probe to study the properties of the estradiol binding site (see below). The potentiation of  $[Ca^{2+}]_i$  signals by xenoestrogens is expected to produce an enhanced insulin secretion as demonstrated previously for 17 $\beta$ -estradiol (13).

**A Common Membrane Binding Site for Xenoestrogens and 17 $\beta$ -Estradiol.** The mimicry found between BPA and DES with 17 $\beta$ -estradiol led us to examine whether xenoestrogens act by interacting with the same membrane binding site as the endog-



**Fig. 2.** E-HRP binding assay. (A) Binding of E-HRP (100 nM) to nonpermeabilized pancreatic islet cells in primary culture visualized by transmission (LSM) laser scanning. (B) Binding of E-HRP is blocked by using 300-fold excess 17β-estradiol. (C) Change in the intensity of light versus length along yellow lines in A. Intensity was measured on an arbitrary gray scale from 0 (blackest) to 255 (whitest). The black line corresponds to the control (cell in A) and the red line to the estradiol-blocked cell (cell in B). The horizontal black lines are the mean of the light intensity values within the cell, which are used as a measurement of the absorbed intensity of light in each condition. (D) Competition of E-HRP binding by increasing concentrations of 17β-estradiol. The quantity of E-HRP bound is expressed as the percentage of absorbed light with respect to the control condition. The lower the percentage of absorbed light the higher the competition for an E-HRP binding site. The control contained the same concentration of DMSO used for experiments. The results are expressed as the mean ± SEM of at least three different experiments with duplicate or triplicate samples. Bkg is the background absorbed light obtained by using HPR instead of E-HRP (see *Methods*). At least 50–100 single cells were counted per coverslip.

enous hormone. We have used a binding assay method based on binding of estradiol conjugated with HRP (E-HRP) as a specific probe to detect estradiol binding sites (13). The DAB-based primary reaction product of peroxidase (DAB or Co-DAB complex) was used as an indication of the amount of E-HRP bound to the estrogen binding site at the membrane of isolated nonpermeabilized cells. This primary reaction product is highly absorptive for laser light at 488 nm and can be easily visualized with high contrast by using transmission laser scanning microscopy (23). Fig. 2A shows two cells stained with E-HRP and developed by using DAB. The binding of E-HRP was blocked by competition with a 300-fold excess of 17β-estradiol as shown in Fig. 2B. A comparative numerical assessment of absorption intensities in single cells can be made by measuring the absorbed light in each desired condition (Fig. 2C). The quantity of E-HRP bound is expressed as the percentage of absorbed light with



**Fig. 3.** Competition of E-HRP binding by estriol, 17β-estradiol, DES, BPA, and o,p'-DDT, all used at 30 μM. The results are expressed as the mean ± SEM of at least four different experiments with duplicate or triplicate samples.

respect to the control condition. The lower the percentage of absorbed light the higher the competition for an E-HRP binding site. Fig. 2D shows how E-HRP binding was blocked by competition with 17β-estradiol in a dose-dependent manner. By using the described methodology, we were able to demonstrate that BPA, DES, and 17β-estradiol all compete for the same E-HRP binding site (Fig. 3). The pesticide o,p'-DDT, which was weaker in inducing  $[Ca^{2+}]_i$  signals, presented low competition. However, we should note that 100 nM o,p'-DDT modified the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$ . This finding may indicate the presence of an alternative pathway used for other xenoestrogens with a different chemical structure than BPA and DES. Estriol, which did not present estrogenic activity on the  $[Ca^{2+}]_i$  signal (13), was used as a negative control with no effect on E-HRP binding (Fig. 3).

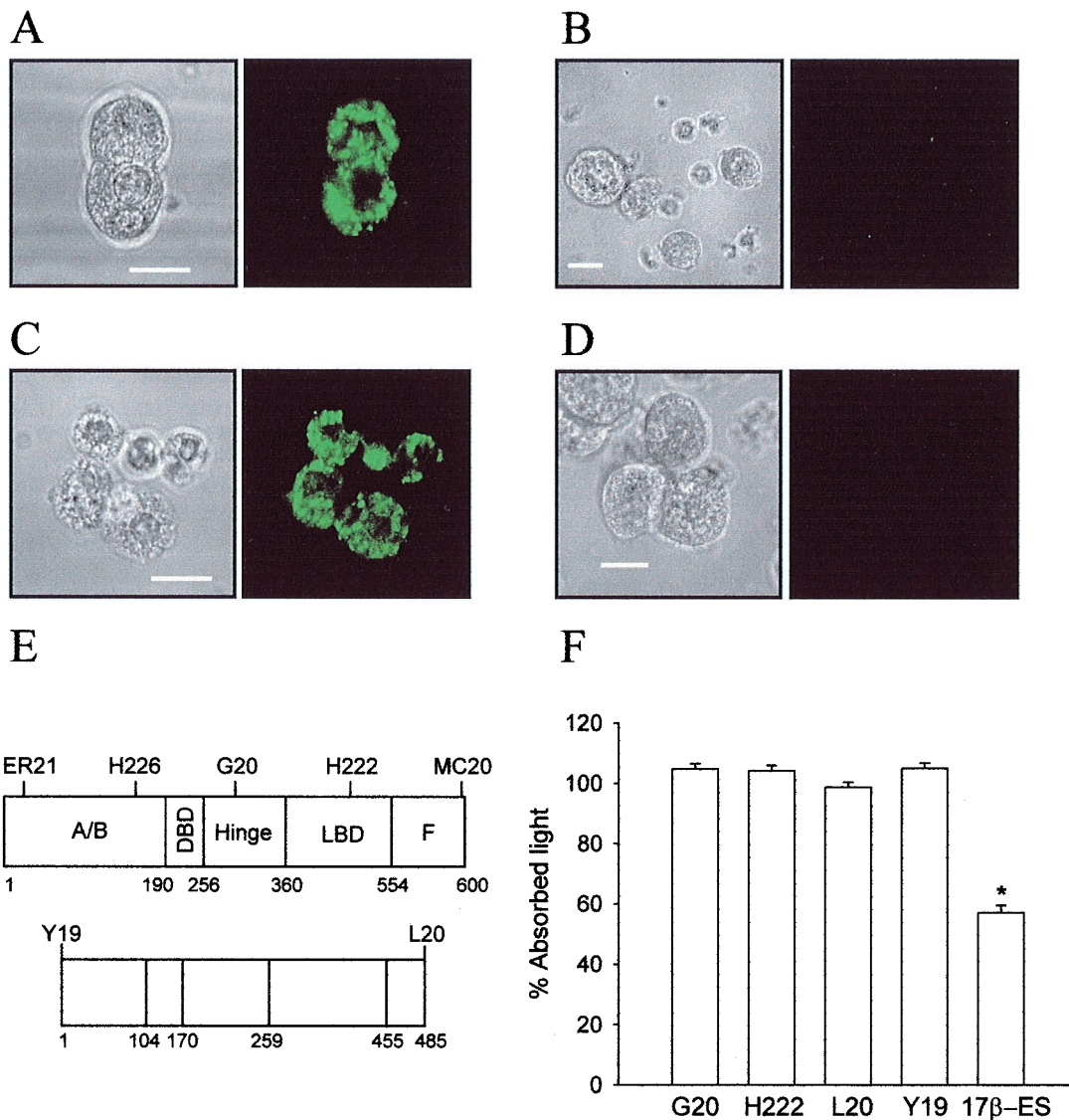
**The Membrane Estrogen Receptor Is Unrelated to ERα and ERβ.** The results presented up to now highly suggest that a common signal-generating receptor exists for 17β-estradiol and xenoestrogens on the cell surface of pancreatic β cells. Several reports have described the existence of proteins in the plasma membrane that cross-react with antibodies raised against cytosolic classical estrogen receptor (24, 25). These estrogen binding membrane proteins are functional in producing prolactin release from pituitary tumor cells (26).

We have studied the possible structural similarity between the membrane estrogen binding site found in β cells and the intracellular estrogen receptors ERα and ERβ. Immunocytochemistry was performed, using five different antibodies raised against ERα and two anti-ERβ antibodies (Fig. 4E). It has been previously described that all of the used anti-ERα antibodies stain the plasma membrane of GH3/B6 rat pituitary tumor cell line and compete for an estradiol binding site (8, 24). Fig. 4A shows the staining of the cytoplasm with the H222 antibody, raised against the ligand binding domain of ERα, yet the plasma membrane was completely unstained (Fig. 4B). The same result was obtained with all of the anti-ERα antibodies described in Fig. 4E. To complete our study, we used two antibodies raised against the N terminus and the C terminus of ERβ. Neither one stained the membrane, yet both labeled the cytoplasm (Fig. 4C and D). When the impeded ligand binding assay, using the antibodies G20 and H222 for ERα and Y19 and L20 for ERβ, was performed, none of them competed with E-HRP (Fig. 4F).

We conclude that the membrane estrogen receptor presents a different structure to that of ERα and ERβ.

**The Plasma Membrane Estrogen Receptor Is a Catecholaminergic Receptor.** There is evidence that indicates that 17β-estradiol and the catecholesterogen 2-hydroxyestradiol may act by binding at the catecholamine receptors. For instance, competition of these two estrogens for dopamine and norepinephrine (NE) receptor





**Fig. 4.** (A) Anti-ER $\alpha$  antibody H222 stains the cytoplasm of permeabilized  $\beta$  cells in primary culture. (B) Absence of staining at the plasma membrane of nonpermeabilized  $\beta$  cells with anti-ER $\alpha$  antibody H222. These cells were from the same culture as the cells in A. (C) Anti-ER $\beta$  antibody Y19 stains the cytoplasm of permeabilized  $\beta$  cells in primary culture. (D) Lack of staining of Y19 antibody at the membrane of nonpermeabilized cells. These cells were from the same culture as those in C. Fluorescence pictures are on the right and their corresponding transmission pictures are on the left. Results are representative of three different duplicated experiments. (E) Epitopes of the intracellular ER $\alpha$  (upper map of the peptide) and ER $\beta$  (lower map of the peptide) by available anti-ER $\alpha$  and anti-ER $\beta$  antibodies. Epitopes are located by the antibodies named above. (F) Impeded binding ligand assay. E-HRP binding was not blocked either by anti-ER $\alpha$  antibodies H222 and G20 or by anti-ER $\beta$  antibodies Y19 and L20. Data are from three duplicated experiments, expressed as mean  $\pm$  SEM, \*,  $P < 10^{-5}$  Student's *t* test. (Scale bars are 10  $\mu$ m.)

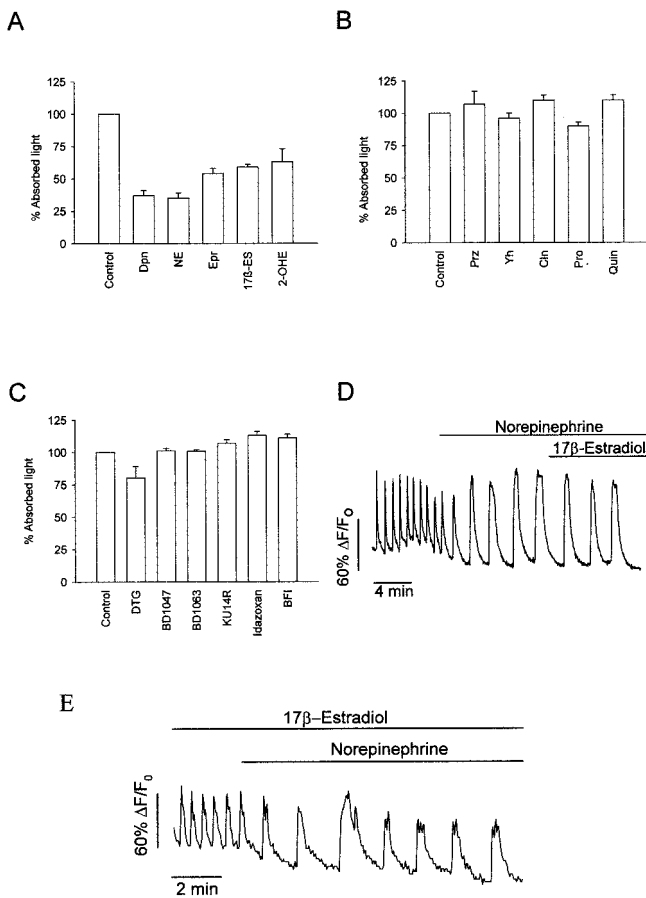
binding has been described in membranes prepared from the cerebral cortex of the rat (27). It has been suggested that the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor mediates the effect of 2-hydroxyestradiol on insulin secretion (28).

To study the possible implication of a catecholamine receptor in the actions described in this paper, we performed a competition of 2-hydroxyestradiol, dopamine, NE, and epinephrine for E-HRP binding. Remarkably, the binding of E-HRP was blocked equally as well by the three catecholamines as by the catecholestrogen 2-hydroxyestradiol (Fig. 5A).

To establish the pharmacological profile of the membrane estrogen binding site described here and to compare it with that of adrenergic and dopaminergic receptors, the experiment in Fig. 5B was performed. The binding of E-HRP was unaffected by prazosin at concentrations higher than the one required to

completely occupy  $\alpha_1$ -adrenergic receptors (29). Similar results were obtained with the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor ligands, yohimbine and clonidine, with propranolol, a  $\beta$ -adrenergic receptor ligand, and with the D<sub>2</sub> dopamine receptor antagonist quinpirole (Fig. 5B). Binding of E-HRP seems to be specifically blocked by compounds with catechol rings and those with the A ring of 17 $\beta$ -estradiol. Other lipophilic substances containing neither catechol nor A rings, such as sigma and imidazoline binding site ligands, had no effect (Fig. 5C).

The functional interaction between 17 $\beta$ -estradiol and catecholamines was studied by measuring the effect of 17 $\beta$ -estradiol on NE and dopamine-induced changes in  $[Ca^{2+}]_i$ . The application of 100 nM NE led to a modification of the  $[Ca^{2+}]_i$  pattern, mainly because of the activation of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor (30). When 17 $\beta$ -estradiol was applied in the presence of NE, it



**Fig. 5.** General properties of the plasma membrane estrogen receptor. (A) Competition of E-HRP binding by the catecholamines dopamine (Dpn), NE, and epinephrine (E) and the catecholestrogen 2-hydroxyestradiol. These catechol-derived chemicals competed for the E-HRP binding as much as 17 $\beta$ -estradiol itself or even more as was the case of dopamine and NE. All of these chemicals were from Sigma. (B) Competition of E-HRP binding by the  $\alpha_1$ -adrenergic ligand prazosin (Prz),  $\alpha_2$ -adrenergic ligands yohimbine (Yh) and clonidine (Cln),  $\beta$ -adrenergic ligand propranolol (Pro), and the dopamine D<sub>2</sub> receptor ligand quinpirole (Quin). Chemicals were from Tocris Neuramin, Bristol, U.K. (C) Absence of effect on the E-HRP binding of the  $\sigma$ -receptor ligands 1,3-Di(2-tolyl) guanidine (DTG), BD1047, and BD1063 and the imidazoline binding site ligands KU14R, Idazoxan, and 2-BFI. All of the substances were used at 30  $\mu$ M concentration, but E-HRP was used at 100 nM. DMSO was used as a vehicle for liposoluble chemicals and had no effect on the E-HRP binding at the concentrations used. Results are representative of at least two different triplicate experiments. Chemicals were from Tocris. (D) Change in fluorescence intensity of Fluo-3 in single pancreatic  $\beta$  cells within intact islets of Langerhans. Islets were perfused with 8 mM glucose, and 100 nM NE was applied as specified by the bar. Once a stable [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> pattern was established, 100 nM 17 $\beta$ -estradiol was added, producing no change in the frequency of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations ( $0.7 \pm 0.2$  min<sup>-1</sup> NE,  $0.9 \pm 0.3$  NE + 17 $\beta$ -estradiol,  $n = 3$  islets). When dopamine was used instead of NE, essentially the same results were obtained ( $0.8 \pm 0.1$  min<sup>-1</sup> dopamine;  $0.6 \pm 0.2$  dopamine + 17 $\beta$ -estradiol,  $n = 8$  islets). (E) Change in fluorescence intensity of Fluo-3 in single pancreatic  $\beta$  cells within intact islets of Langerhans. Islets were perfused with 8 mM glucose, and 100 nM 17 $\beta$ -estradiol was applied. Once a stable [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> pattern was established, 100 nM NE was applied. The change in the frequency of oscillations was from  $2.2 \pm 0.2$  min<sup>-1</sup> in the presence of estradiol to  $0.67 \pm 0.04$  min<sup>-1</sup> with NE ( $n = 3$  islets). The same result was essentially obtained when using 10  $\mu$ M 17 $\beta$ -estradiol. In control experiments the frequency was  $1.3 \pm 0.1$  min<sup>-1</sup> with 8 mM glucose only and decreased to  $0.57 \pm 0.11$  with NE ( $n = 7$  islets).

had no effect on the oscillatory pattern (Fig. 5D). When NE was applied in the presence of a high concentration of 17 $\beta$ -estradiol, which should saturate all estradiol binding sites, the NE response was unchanged (Fig. 5E).

Essentially the same results were obtained when dopamine was used instead of NE. Accordingly, NE and dopamine appear to antagonize the nongenomic action of 17 $\beta$ -estradiol on the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signal, likely by binding at the same receptor. The fact that high concentrations of 17 $\beta$ -estradiol (100 nM and 10  $\mu$ M) had no effect on the NE response indicates that this receptor should be different from the classic  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic receptor.

## Discussion

This report demonstrates that the circulating hormone 17 $\beta$ -estradiol and the xenoestrogens BPA and DES enhance the frequency of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in pancreatic  $\beta$  cells within intact islets of Langerhans. The effect of these agents, although modest, is well within the range of other insulin secretion modulators such as vasoactive intestinal polypeptide (31), gastrin releasing peptide (32), and glucagon-like peptide-1 (33). Because insulin secretion mirrors the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> pattern (34, 35) a rise of insulin secretion would be expected, as previously described for 17 $\beta$ -estradiol (13). This nongenomic effect is triggered by remarkably low concentrations of BPA and DES, within the nanomolar range. The strong action of BPA is remarkable, because it has been shown to behave as a weaker estrogen, about 1,000- to 2,000-fold less potent than 17 $\beta$ -estradiol when interacting with the nuclear estrogen receptor (36, 37). This finding indicates an action via a receptor different to the nuclear estrogen receptor.

It has been suggested that estrogen receptors at the plasma membrane may be involved in the rapid nongenomic effects of estrogens in several types of cells (38, 39), including pancreatic  $\beta$  cells (13, 14) although their characterization remains unresolved. Several presumptions about the molecular structure of the estrogen receptor involved in acute actions of estrogens and xenoestrogens have been suggested. Evidence has been published showing that the membrane estrogen receptor has a similar structure to ER $\alpha$  (24, 25, 40). This receptor would be implicated in triggering nongenomic actions of xenoestrogens (8). In contrast, evidence against that hypothesis also has been reported (28, 41–43). We have demonstrated here the existence of a membrane estrogen receptor involved in the nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens, unrelated to both ER $\alpha$  and ER $\beta$ .

The latter is also the case with a recently characterized putative progesterone membrane binding protein, which shows no significant identity to the classic intracellular receptor (44, 45). Likewise, testosterone acts via a plasma receptor, which differs from the intracellular androgen receptor (46). These data may indicate the existence of a membrane steroid receptor superfamily, which is different from that of intracellular steroid receptors.

This membrane estrogen receptor not only binds 17 $\beta$ -estradiol, BPA, and DES but also the neurotransmitters epinephrine, NE, and dopamine. An excitatory receptor equally activated by dopamine, epinephrine, and NE has been described in the vascular (47–49) and nervous systems (50, 51). This receptor is pharmacologically different from the  $\alpha$  or  $\beta$  adrenergic receptor. It is affected neither by the  $\alpha$  nor the  $\beta$  antagonist, and it has been defined as the  $\gamma$ -adrenergic receptor (47–49). These properties match those described for the membrane estrogen binding site in the present work.

Moreover, the pathway involved in  $\gamma$ -adrenergic receptor action is a nitric oxide-independent guanylyl cyclase, which increases cGMP, activating protein kinase G (51). This pathway exactly matches the one used by 17 $\beta$ -estradiol for modulating [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signals and K<sub>ATP</sub> channels in pancreatic  $\beta$  cells (14). The findings show that the so-called  $\gamma$ -adrenergic receptor behaves as a membrane estrogen receptor.

Our results demonstrate a functional membrane receptor activated by the endogenous hormone 17 $\beta$ -estradiol as well as by

the xenoestrogens BPA and DES, providing knowledge about the molecular mechanism involved in the nongenomic action of xenoestrogens.

The data define the pharmacological properties of this type of membrane estrogen receptor and unveil a level of cross-talk between estrogens and biogenic catecholamines. The latter may constitute an important link between the endocrine and the nervous systems.

We thank E. Perez Garcia and A. Perez Vegara for technical assistance and Drs. Pedro Verdugo, Ivan Quesada, and Cristina Ripoll for their help in several aspects of the project. This work was supported by Grants from Ministerio de Educación y Cultura (Grants PM98/0105 and PM99/0142); European Union-Comision Interministerial de Ciencia y Tecnologia (IFD97-1065-103-02), and Fundació Marató TV3 (99-1210). A.B.R. is a recipient of a research scholarship from the Ministerio de Educación y Cultura, O.L. is a recipient of a scholarship from the Ministerio de Asuntos Exteriores, and M.M. was an ERASMUS/SOCRATES program student.

- Guillette, L. J., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F. & Woodward A. R. (1994) *Environ. Health Perspect.* **102**, 680–688.
- Guillette, L. J., Pickford, D. B., Crain, D. A., Rooney, A. A. & Percival, H. F. (1996) *Gen. Comp. Endocrinol.* **101**, 32–42.
- Sonnenschein C. & Soto, A. M. (1998) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **65**, 143–149.
- Mueller, G. & Kim, U. H. (1978) *Endocrinology* **102**, 1429–1435.
- McLachlan, J. A. (1993) *Environ. Health Perspect.* **101**, 386–387.
- Soto, A. M., Chung, K. L. & Sonnenschein, C. (1994) *Environ. Health Perspect.* **102**, 380–383.
- Ruehlmann, D. O., Steinert, J. R., Valverde, M. A., Jacob, R. & Mann, G. E. (1998) *FASEB J.* **12**, 613–619.
- Watson, C. S., Campbell, C. H. & Gametchu, B. (1999) *Exp. Physiol.* **84**, 1013–1022.
- Pietras, R. J. & Szego, C. M. (1977) *Nature (London)* **265**, 69–72.
- Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M. & Olea, N. (1994) *Environ. Health Perspect.* **103**, 608–612.
- Steinmetz, R., Mitcher, N. A., Grant, A., Allen, D. L., Bigsby, R. M. & Ben-Jonathan, N. (1998) *Endocrinology* **139**, 2741–2747.
- Das, S. & Thomas, P. (1999) *Endocrinology.* **140**, 1953–1956.
- Nadal, A., Rovira, J. M., Laribi, O., León-Quinto, T., Andreu, E., Ripoll, C. & Soria, B. (1998) *FASEB J.* **12**, 1341–1348.
- Ropero, A. B., Fuentes, E., Rovira, J. M., Ripoll, C., Soria, B. & Nadal, A. (1999) *J. Physiol. (London)* **521**, 397–407.
- Nadal, A., Valdeolmillos, M. & Soria, B. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, E769–E774.
- Nadal, A., Quesada, I. & Soria, B. (1999) *J. Physiol. (London)* **517**, 85–93.
- Quesada, I., Nadal, A. & Soria, B. (1999) *Diabetes* **48**, 2390–2397.
- Valdeolmillos, M., Nadal, A., Contreras, D. & Soria, B. (1992) *J. Physiol. (London)* **455**, 173–186.
- Greene, G. L., Sobel, N. B., King, W. J. & Jensen, E. V. (1984) *J. Steroid. Biochem.* **20**, 51–56.
- Kumar, V., Green, G. L., Staub, A. & Chambon, P. (1986) *EMBO J.* **5**, 2231–2236.
- Blaustein, J. D. (1993) *Endocrinology* **132**, 1218–1224.
- Hess, R. A., Gist, D. H., Bunick, D., Lubahn, D. B., Farrell, A., Bahr, J., Cooke, P. S. & Greene, G. L. (1997) *J. Androl.* **18**, 602–611.
- Halbhuber, K. J., Krier, R. & König, K. (1998) *Cell. Mol. Biol.* **44**, 807–826.
- Pappas, T. C., Gametchu, B. & Watson, C. S. (1995) *FASEB J.* **9**, 404–410.
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L. & Levin E. R. (1999) *Mol. Endocrinol.* **13**, 307–319.
- Norfleet, A. M., Clarke, C. H., Gametchu, B. & Watson, C. S. (2000) *FASEB J.* **14**, 157–165.
- Paden, C. M., McEwen, B. S., Fishman, J., Snider, L. & DeGroff, V. (1982) *J. Neurochem.* **39**, 512–520.
- Etchegoyen, G. S., Borelli, M. I., Rossi, J. P. F. C. & Gagliardino, J. J. (1998) *Diabetes Metab.* **24**, 428–433.
- Davey, M. J. (1980) *Med. J. Aust.* **2**, 4–8.
- Chan, S. L. (1993) *Clin. Sci.*, **85**, 671–677.
- Jensen, S. L., Fahrenkrug, J., Holst, J. J., Vang Nielsen, O. & Schaffalitzky de Muckadell, O. B. (1978) *Am. J. Physiol.* **235**, E387–E391.
- Wahl, M. A., Plehn, R. J., Landsbeck, E. A., Verspohl, E. J. & Ammon, H. P. T. (1991) *Endocrinology* **128**, 3247–3252.
- Holz, G. G., Kühtreiber, W. H. & Habener, J. F. (1993) *Nature (London)* **361**, 362–365.
- Martin, F., Sánchez-Andrés, J. V. & Soria, B. (1995) *Diabetes* **44**, 300–305.
- Barbosa, R. M., Silva, A. M., Tome, A. R., Stamford, J. A., Santos, R. M. & Rosario, L. M. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**, 100–104.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permeth, S. F., Tokes, L. & Feldman, D. (1993) *Endocrinology* **132**, 2279–2286.
- Kuiper, G. G. M. J., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. & Gustafsson, J. (1997) *Endocrinology.* **138**, 863–870.
- Wehling, M. (1997) *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 365–393.
- Alonso, R. & López-Coviella, I. (1998) *Neurochem. Res.* **23**, 679–692.
- Chen, Z., Yuhanna, I. S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R. H., Mendelsohn, M. E. & Shaul, P. W. (1999) *J. Clin. Invest.* **103**, 401–406.
- Zheng, J. B. & Ramirez, V. D. (1999) *J. Steroids Biochem. Mol. Biol.* **68**, 65–75.
- Gu, Q., Korach, K. S. & Moss, R. L. (1999) *Endocrinology* **140**, 660–666.
- Valverde, M. A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orío, P., Bahamonde, M. I., Mann, G. E., Vergara, C. & Latorre, R. (1999) *Science* **285**, 1929–1931.
- Gerdes, D., Wehling, M., Leube, B. & Falkenstein, E. (1998) *Biol. Chem.* **379**, 907–911.
- Falkenstein, E., Heck, M., Gerdes, D., Grube, D., Christ, M., Weigel, M., Buddhikot, M., Meizel, S. & Wehling, M. (1999) *Endocrinology* **140**, 5999–6002.
- Benten, W. P. M., Lieberherr, M., Stamm, O., Wrehlke, C., Guo, Z. & Wunderlich, F. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 3113–3123.
- Hirst, G. D. S. & Neild, T. O. (1980) *Nature (London)* **283**, 767–768.
- Hirst, G. D. S., Neild, T. O. & Silverberg, G. D. (1982) *J. Physiol. (London)* **328**, 351–360.
- Benham, C. D. & Tsien, R. W. (1988) *J. Physiol. (London)* **404**, 767–784.
- Yawo, H. (1996) *J. Physiol. (London)* **493**, 385–391.
- Yawo, H. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 5293–5300.

## **ANEXO III**



# A Nonclassical Estrogen Membrane Receptor Triggers Rapid Differential Actions in the Endocrine Pancreas

ANA B. ROPERO, BERNAT SORIA, AND ANGEL NADAL

*Institute of Bioengineering, Miguel Hernández University, Campus of San Juan, Alicante 03550, Spain*

Glucose homeostasis in blood is mainly maintained by insulin released from  $\beta$ -cells and glucagon released from  $\alpha$ -cells, both integrated within the pancreatic islet of Langerhans. The secretory processes in both types of cells are triggered by a rise in intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). In this study, rapid effects of the natural hormone E2 on  $[Ca^{2+}]_i$  were studied in both types of cells within intact islets using laser scanning confocal microscopy.  $\alpha$ - And  $\beta$ -cells showed opposite  $[Ca^{2+}]_i$  responses when stimulated with physiological concentrations of  $17\beta$ -E2. Although the estrogen produced an increase in the frequency of glucose-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in insulin-releasing  $\beta$ -cells, it prevented the low glucose-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in glucagon-releasing  $\alpha$ -cells. The effects of  $17\beta$ -E2 on  $\alpha$ -cells were mimicked by the cGMP permeable analog 8bromo-cGMP and blocked by the cGMP-dependent protein kinase

(PKG) inhibitor KT5823. Evidence indicated that these were membrane actions mediated by a nonclassical ER. Both effects were rapid in onset and were reproduced by  $17\beta$ -E2 linked to horseradish peroxidase, a cell-impermeable molecule. Furthermore, these actions were not blocked by the specific ER blocker ICI 182,780. Competition studies performed with  $17\beta$ -E2 linked to horseradish peroxidase binding in  $\alpha$ -cells supported the idea that the membrane receptor involved is neither ER $\alpha$  nor ER $\beta$ . Additionally, the binding site was shared by the neurotransmitters epinephrine, norepinephrine, and dopamine and had the same pharmacological profile as the receptor previously described for  $\beta$ -cells. Therefore, rapid estrogen actions in islet cells are initiated by a nonclassical estrogen membrane receptor. (*Molecular Endocrinology* 16: 497-505, 2002)

PANCREATIC ISLETS OF Langerhans are composed of a heterogeneous population of cells: insulin-secreting  $\beta$ -cells (65-90%), glucagon-releasing  $\alpha$ -cells (15-20%), somatostatin-producing  $\delta$ -cells (3-10%), and pancreatic polypeptide-producing cells (1%). Interaction between the different cell types within the islet is vital for an adequate control of insulin release. A diminished glucose-induced insulin secretion results in non-insulin-dependent diabetes mellitus, responsible for 75% of the diabetic syndromes.

The hormones, insulin and glucagon, are released in a  $[Ca^{2+}]_i$ -dependent manner (1).  $\beta$ -Cells respond to an increase of extracellular glucose by increasing insulin secretion. The stimulus-secretion coupling process involves glucose metabolism, which provokes the closure of ATP-dependent potassium channels ( $K_{ATP}$ ), responsible for the resting membrane potential. As a result, the plasma membrane depolarizes, opening the voltage-dependent calcium channels and increasing  $[Ca^{2+}]_i$  (2-4). Glucose-induced  $Ca^{2+}$  signals in  $\beta$ -cells within the islet of Langerhans are organized in a synchronous and homogeneous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillatory pat-

tern. This is a consequence of the bursting pattern of electrical activity characteristic of pancreatic  $\beta$ -cells (5-7). As a result, pulsatile insulin secretion is triggered (8-10).

As opposed to  $\beta$ -cells,  $\alpha$ -cells release glucagon at low glucose values (11, 12). These cells contain a specific set of ion channels, responsible for their electrical activity (13, 14). Consequently,  $[Ca^{2+}]_i$  oscillates at low glucose concentrations, both in cultured cells (15) and in intact islets (7). Due to the calcium influx, the exocytotic machinery is initiated and glucagon is released (16). When extracellular glucose concentration increases to the level needed for insulin release,  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and glucagon release decrease (7, 12).

Both insulin and glucagon secretion are modified by the presence of  $17\beta$ -E2 (17-19), but its mechanism of action is only partially known in  $\beta$ -cells and is unknown in  $\alpha$ -cells. An estrogen membrane receptor has been visualized in pancreatic  $\beta$ -cells, responsible for a rapid insulinotropic effect of  $17\beta$ -E2 (19). The estrogen binds to its membrane receptor and triggers cyclic GMP (cGMP) synthesis, which activates protein kinase G (PKG). The  $K_{ATP}$  channels close in a PKG-dependent manner, and therefore the plasma membrane depolarizes, enhancing  $[Ca^{2+}]_i$  signals (20). As a consequence, insulin secretion is increased (19).

Abbreviations: 8Br-cGMP, 8-Bromo-cGMP; Co-DAB, 3,3'-diaminobenzidine in the presence of  $CoCl_2$ ; E-HRP, E2 conjugated to horseradish peroxidase;  $K_{ATP}$ , ATP-dependent potassium channel; PKG, protein kinase G.

The pancreatic islet of Langerhans is not the only system in which estrogens produce nongenomic actions through a plasma membrane receptor. There is a great variety of effects in different cell types. MAPK, cAMP, cGMP, and NO are some of the intracellular mechanisms involved in rapid actions of estrogens (21–23). Other hydrophobic hormones act through a similar nongenomic mechanism (24, 25).

Despite the long list of effects of E2 on the plasma membrane, the nature of the receptor involved remains elusive. Some evidence show that the intracellular ERs, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , may behave as membrane receptors (26, 27). However, this hypothesis is not supported by other studies, which demonstrate the involvement of a different estrogen membrane receptor (28–32).

The ER that mediates the actions of 17 $\beta$ -E2 in pancreatic  $\beta$ -cells is unrelated to the classical ER $\alpha$  and ER $\beta$  and has the pharmacological profile of the so-called “ $\gamma$ -adrenergic receptor” (31).

In the present work, we have studied the modulatory effect of 17 $\beta$ -E2 on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells within intact islets of Langerhans. These actions are triggered after E2 binds to a common estrogen membrane receptor, which is different than the classical ERs, ER $\alpha$  and ER $\beta$ . Following the Mannheim classification of nongenomic steroid actions (25), we have named it the nonclassical estrogen membrane receptor (ncmER).

## RESULTS

### $\alpha$ - and $\beta$ -Cells [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Responses to 17 $\beta$ -E2

To investigate the effect of 17 $\beta$ -E2 on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in individual  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells within intact islets of Langerhans, isolated islets were loaded with the fluorescent calcium-sensitive dye Fluo-3, and changes in fluorescence were monitored using laser scanning confocal microscopy (33). Only the periphery of the islet was loaded in all cases as shown in Fig. 1A and described previously (7). Nonetheless, all cell types that form part of the islets were represented at the periphery and were easily distinguishable by their [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response to glucose.  $\beta$ -Cells were characterized by a synchronous oscillatory pattern on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in the presence of 7–16 mM glucose, whereas they remained silent in its absence. On the contrary, glucagon-containing  $\alpha$ -cells presented an oscillatory [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> pattern in the absence of glucose, which diminished as glucose concentration was increased (7, 34).

When a physiological concentration of 17 $\beta$ -E2, 1 nM, was applied to a  $\beta$ -cell, an increase in the frequency of glucose-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations was recorded (Fig. 1B), as previously described (19, 20). Typical  $\alpha$ -cells presented an oscillatory [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> pattern in the absence of glucose, which was completely abolished by 17 $\beta$ -E2 in 51% of the cells (38 of 75) in 10.1  $\pm$  0.9 min (Fig. 1C). In 29% of the cells (22 cells of 75 tested), a decrease of 37  $\pm$  4% in the frequency of the

oscillations was observed after 10 min of E2 application. There was no effect in 20% of the cells (15 of 75) even after 25 min of E2 exposure. The rapid effect of E2 in  $\alpha$ -cells should be triggered at the plasma membrane because it is rapid in onset and was reproduced by the membrane-impermeable E2 conjugated to horseradish peroxidase (E-HRP) (Fig. 1D). E-HRP, 1 nM, abolished [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in 49% of the  $\alpha$ -cells (26 cells of 53 tested) in 10.5  $\pm$  1.0 min and decreased the frequency of 31  $\pm$  5% in 30% of the cells (16 of 53), with no effect in 21% of the cells (11 of 53).

These results demonstrate an opposite effect of E2 in  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells within the islet of Langerhans. On the one hand, 17 $\beta$ -E2 increases the frequency of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in  $\beta$ -cells, producing an increase in insulin secretion (19). On the other hand, 17 $\beta$ -E2 abolishes the low glucose-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in  $\alpha$ -cells and as a consequence, glucagon secretion will diminish (16).

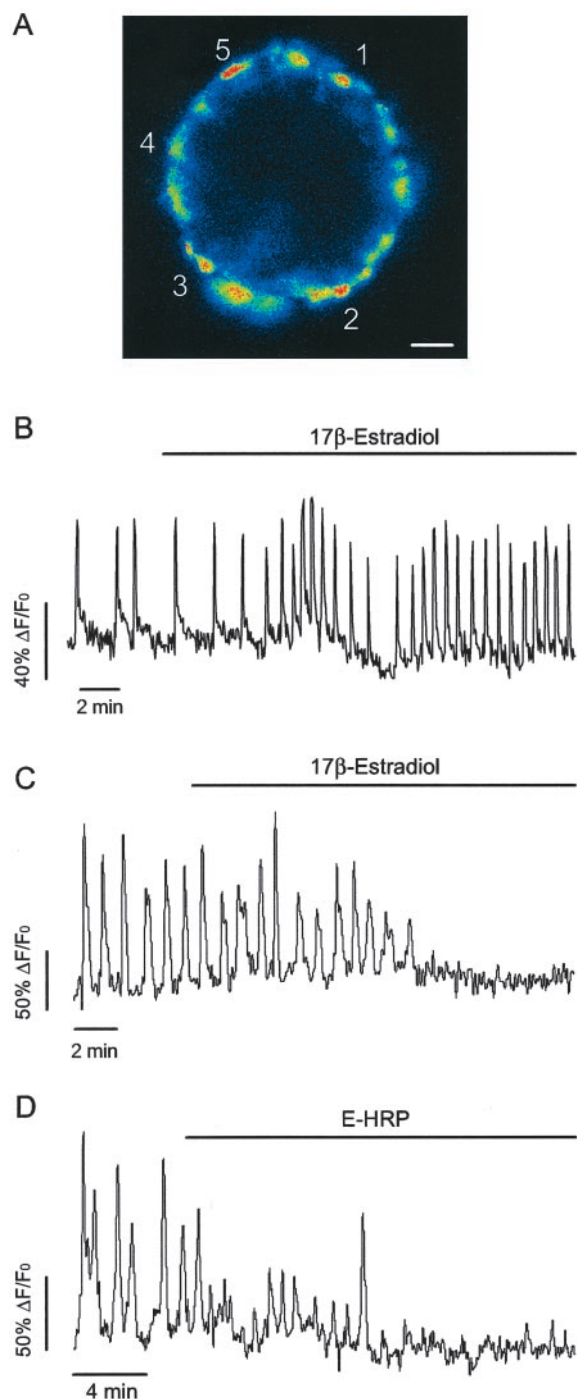
### cGMP Mediates 17 $\beta$ -E2 Actions on $\alpha$ -Cells

To examine the involvement of cGMP in the inhibition of low glucose-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations, 8-bromo-cGMP (8Br-cGMP) was tested in the virtual absence of glucose (0.5 mM). Application of 8Br-cGMP at concentrations as low as 10  $\mu$ M reproduced the effect of 17 $\beta$ -E2 on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Fig. 2A). The cGMP analog completely abolished low glucose-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in 56% of the cells (32 of 57 cells tested), in 18% of the cells the frequency was decreased by 25  $\pm$  5% (10 of 57 cells), and in 26% cGMP had no effect. In most cellular systems, including pancreatic  $\beta$ -cells (20), cGMP activates the regulatory subunit of cGMP-dependent protein kinase (PKG). Therefore, if PKG were involved in 17 $\beta$ -E2 action, then inhibition of the kinase would abolish the E2-induced blockade of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations. Application of a low dose of KT5823, a specific inhibitor of PKG, completely inhibited the effect of 17 $\beta$ -E2 on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signals in 55% of the cells tested (11 of 20 cells) (Fig. 2B). These results are consistent with 17 $\beta$ -E2 modulating [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signals by a PKG-dependent mechanism, although they do not exclude participation of other second messengers.

### Rapid 17 $\beta$ -E2 Effects in both $\alpha$ - and $\beta$ -Cells Are Independent of Classical ER

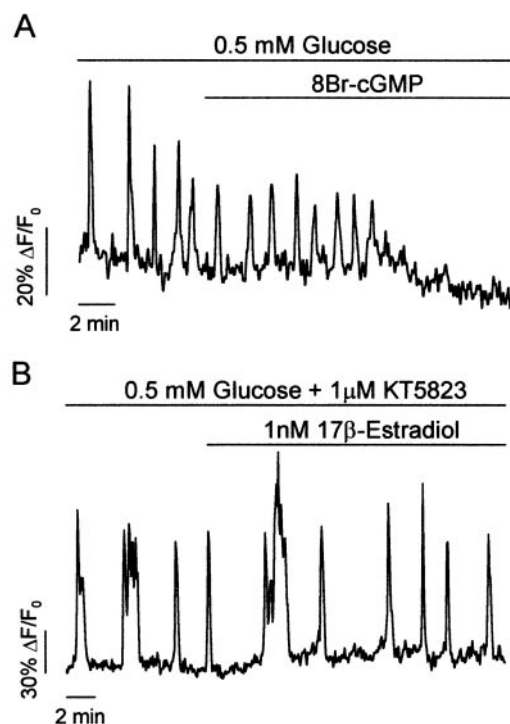
Several reports have described rapid effects of 17 $\beta$ -E2 mediated by either a classical intracellular ER expressed at the plasma membrane or a nonclassical estrogen membrane receptor. The existence of both receptors can be distinguished by their sensitivity to the antiestrogen ICI 182,780. The effects mediated by a classical membrane receptor are blocked by ICI 182,780, whereas nonclassical estrogen membrane receptors are insensitive to the antiestrogen (22, 23, 25).

In the experiment shown in Fig. 3, the mentioned antiestrogen did not modify the responses to 17 $\beta$ -E2



**Fig. 1.** Effects of 1 nM 17 $\beta$ -E2 on  $[Ca^{2+}]_i$  Oscillations in  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cells Within the Islet of Langerhans

A, Image of a Fluo-3-loaded islet exposed to 0.5 mM glucose. Blue corresponds to low and red to high fluorescence intensity. The scale bar at the bottom right represents 20  $\mu$ m. Location of five  $\alpha$ -cells that oscillate at 0.5 mM glucose are labeled with numbers 1 to 5. B–D, Records of fluorescence vs. time from cells within the islet of Langerhans. The  $Ca^{2+}$ -dependent fluorescence of Fluo-3 is expressed as  $\% \Delta F/F_0$  (see *Materials and Methods*). E2 or E-HRP was applied for the period indicated by the horizontal bar. B, Increase of the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in a  $\beta$ -cell induced by 1 nM 17 $\beta$ -E2 in the presence of 8 mM



**Fig. 2.** Involvement of cGMP and PKG in 17 $\beta$ -E2-Induced Abolishment of  $[Ca^{2+}]_i$  Oscillations in  $\alpha$ -Cells

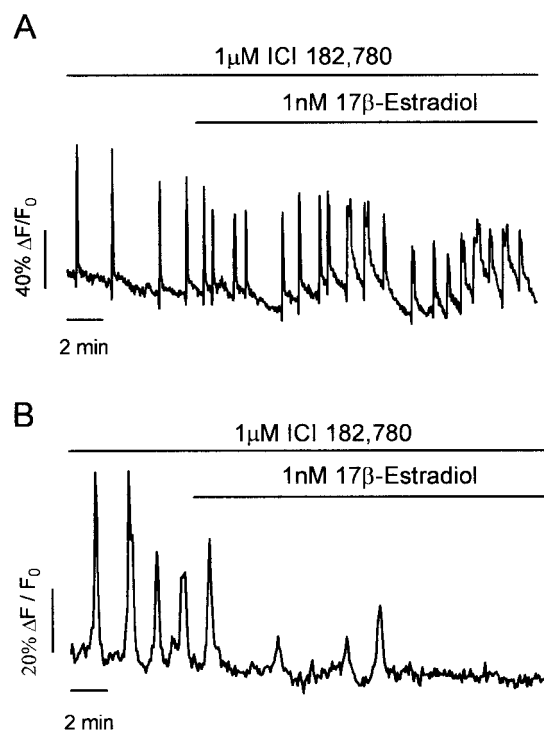
A, Application of 10  $\mu$ M 8Br-cGMP completely abolishes  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations induced by 0.5 mM glucose in  $\alpha$ -cells in 56% of the cells tested. B, 1  $\mu$ M KT5823, an inhibitor of PKG, fully blocked the effect of 1 nM 17 $\beta$ -E2 on  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations induced by 0.5 mM glucose in 55% of the  $\alpha$ -cells tested.

in either  $\beta$ - or  $\alpha$ -cells. For that reason, we conclude that rapid  $[Ca^{2+}]_i$  regulation triggered by 17 $\beta$ -E2 in both  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells should be mediated by a nonclassical ER.

#### Binding Studies Using E-HRP

We have used a binding assay method based on the interaction of E-HRP as a specific probe to detect E2 binding sites at the plasma membrane of nonpermeabilized cells (31). This assay has been combined with immunocytochemistry to specifically study the characteristics of the E2 binding site in  $\alpha$ -cells. Figure 4A shows a cell stained with E-HRP and developed using Co-DAB (3,3'-diaminobenzidine in the presence of  $CoCl_2$ ). On completion of this assay, the cells were permeabilized (see *Materials and Methods*) to identify

glucose. C, Inhibition of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations elicited by 0.5 mM glucose in an  $\alpha$ -cell by E2 (51%, 38 of 75 cells). The mean time for the abolishment of the oscillatory pattern was  $10.1 \pm 0.9$  min. D, 1 nM E-HRP completely abolished  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in an  $\alpha$ -cell (49%, 26 of 53 cells) in  $10.5 \pm 1.0$  min. Note the high grade of mimetism between 17 $\beta$ -E2 and E-HRP effects. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.



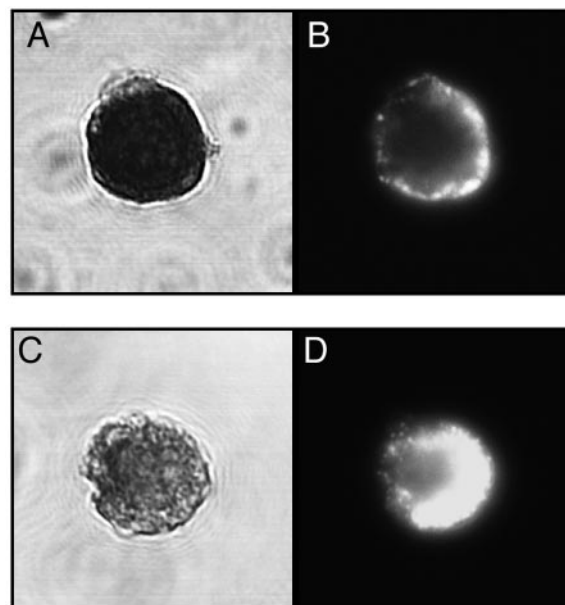
**Fig. 3.**  $17\beta$ -E2 Regulation of  $[Ca^{2+}]_i$  Is Unaffected by ICI 182,780

A, Effect of  $1 \mu M$  ICI 182,780 in the action of  $17\beta$ -E2 on  $[Ca^{2+}]_i$  in a  $\beta$ - and an  $\alpha$ -cell (panel B). ICI was applied during the whole record and E2 during the time indicated by the horizontal bar. Records in the absence of ICI were made as control for the effect of E2 in islets from the same mouse.

glucagon-containing  $\alpha$ -cells by immunocytochemistry (Fig. 4B). The binding of E-HRP was blocked due to the competition with  $17\beta$ -E2 in a dose-dependent manner, which occurred in  $\alpha$ - as well as in non- $\alpha$ -cells (Figs. 4C and 5).

With this approach, we are able to study the properties of the E2 binding site on the  $\alpha$ -cell membranes and also in non- $\alpha$ -cells. The population of non- $\alpha$ -cells will be mainly  $\beta$ -cells, because somatostatin-secreting  $\delta$ -cells and pancreatic polypeptide-containing PP-cells are normally less than 15% of the total population.

Because the effects on  $[Ca^{2+}]_i$  were independent of the classical ER, we tested whether two classic antiestrogens, ICI 182,780 and tamoxifen, interact with the same binding site as E2 on the plasma membrane. Figure 6 shows that neither of these antiestrogens bound to the estrogen membrane receptor, either in  $\alpha$ - or in  $\beta$ -cells, because they did not compete with E-HRP. Furthermore, the H222 antibody raised against the ligand-binding domain of ER $\alpha$  did not compete with E-HRP. This indicates that the ligand-binding domain for this receptor should be different from that in ER $\alpha$ . Therefore, these results and those shown in Fig. 3 demonstrate that the membrane receptor involved in the rapid effect of  $17\beta$ -E2 in



**Fig. 4.** E-HRP Binding at the Plasma Membrane of Glucagon-Containing  $\alpha$ -Cells

E2 competition for the binding site of E-HRP at the plasma membrane of  $\alpha$ -cells. A, Transmission image of a nonpermeabilized cell incubated with  $100 \text{ nM}$  E-HRP and developed with Co-DAB. B, Immunocytochemistry of the cell in panel A with an antiglucagon antibody and a secondary antibody conjugated to tetramethylrhodamine isothiocyanate. The cell was identified as a glucagon-containing  $\alpha$ -cell. C, Competition of  $30 \mu M$   $17\beta$ -E2 for the binding site of E-HRP  $100 \text{ nM}$ . D, Identification of the cell in panel C as an  $\alpha$ -cell by immunocytochemistry. Scale bars,  $5 \mu m$ .

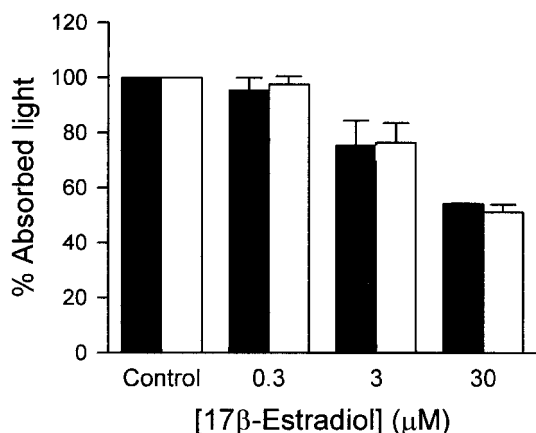
glucagon-containing  $\alpha$ -cells must be different from the classical ER.

### **$17\beta$ -E2 and Catecholamines Share a Common Membrane Receptor**

The results presented up to now strongly suggest the presence of a similar estrogen membrane receptor in  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells. We have recently described an estrogen membrane receptor in pancreatic  $\beta$ -cells that binds  $17\beta$ -E2, catecholestrogens, and, remarkably, catecholamines (31). This receptor differs pharmacologically from the dopamine and the  $\alpha$ - or the  $\beta$ -adrenergic receptors, and it was previously defined as the  $\gamma$ -adrenergic receptor (35).

To study the possible involvement of such a receptor in the effects described in  $\alpha$ -cells, we performed a competition assay with the neurotransmitters epinephrine, norepinephrine, and dopamine. Figure 7A shows that the binding of E-HRP was blocked by the three catecholamines in  $\alpha$ -cells as well as in  $\beta$ -cells. The pharmacological profile was established by the experiment in Fig. 7B. The binding of E-HRP was unaffected by the  $\alpha$ - and the  $\beta$ -adrenergic receptor ligands, clonidine and propranolol, and by the dopaminergic antagonist quinpirole.





**Fig. 5.** Dose-Dependent Competition of E-HRP Binding by 17β-E2

Incubation of fixed nonpermeabilized islet cells in culture with 10 nM E-HRP and increased concentrations of 17β-E2. α-Cells were identified as glucagon-containing cells, and the result was plotted separately (■) from the rest of the cells (□). As shown, there are no differences between the percentages of absorbed light in α-cells and non-α-cells (mostly β-cells, see *Results*) in the same conditions. The results are expressed as the mean ± SEM of three different experiments with duplicate samples.

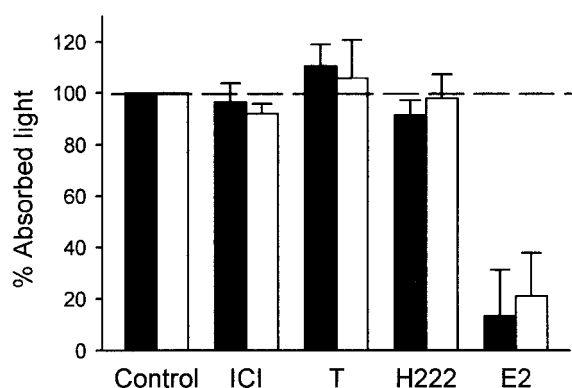
## DISCUSSION

This report demonstrates that physiological concentrations of the gonadal hormone 17β-E2 inhibits the  $[Ca^{2+}]_i$  oscillatory pattern induced by low glucose concentrations in pancreatic α-cells. Because glucagon secretion depends on an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (1), a diminished glucagon secretion is to be expected. Such an effect is in agreement with previous results that described an inhibitory role of 17β-E2 in α-cells using long-term exposure. After E2 exposure for a period of 4–8 h, a dose-dependent inhibitory effect on the arginine-stimulated glucagon secretion was manifested (18).

An increase in plasma levels of 17β-E2 is achieved in proestrus and during pregnancy. In pregnant rats, plasma insulin is increased in response to increased levels of sex steroids (17, 36, 37). Moreover, 17β-E2 at concentrations comparable to that of pregnancy enhances insulin secretion in perfused rat pancreas (38). E2 reverses the effects of menopause on glucose and insulin metabolism, resulting in an increase of pancreatic insulin secretion and a decrease in insulin resistance (39, 40).

Because glucagon inhibits insulin secretion, a decrease of glucagon release may contribute, in a paracrine manner, to the rapid insulinotropic effect manifested by 17β-E2 via a plasma membrane receptor (19).

The mechanism of action of estrogens in α-cells is still greatly unknown; indeed this is the first report describing a rapid effect of 17β-E2 in this particular type of cell. The results presented in this work dem-



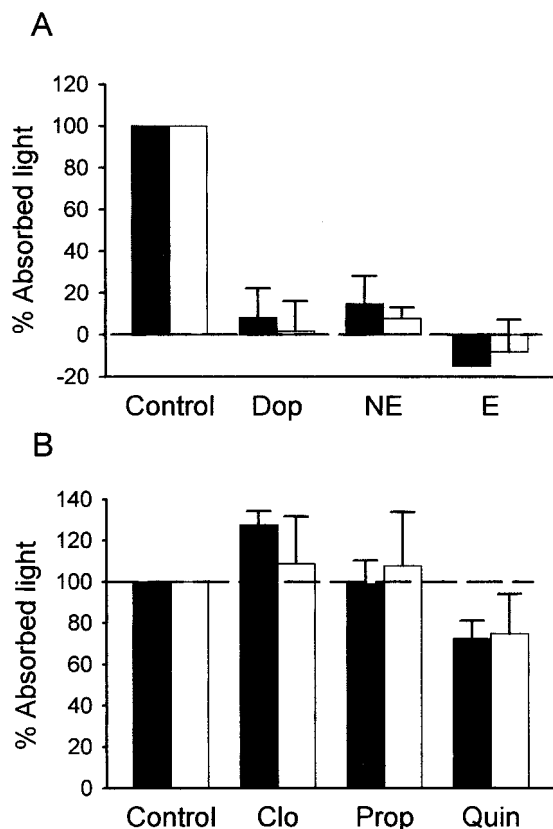
**Fig. 6.** No Competition with Antiestrogens for the E2 Binding Site at the Plasma Membrane of α-Cells

Binding assays with 100 nM E-HRP and competition with 17β-E2 (E2), the antiestrogens ICI 182,780 (ICI) and tamoxifen (T), and the antibody H222 against the ligand binding domain of ERα (H222). All of them were applied at 30 μM and H222 at 1:100 dilution. Neither ICI182,780 nor tamoxifen competed for E-HRP binding, whereas E2 decreased light absorption up to 80%. Neither antiestrogen affected either α- (■) or β-cell (□) binding of E-HRP. Background binding obtained with 100 nM peroxidase has been subtracted. Dimethylsulfoxide was used as a vehicle for insoluble reactives, and it was present both in control and peroxidase samples. Data are from two duplicate experiments, expressed as mean ± SEM.

onstrate that the receptor responsible is located at the plasma membrane. E-HRP, which is membrane impermeable, mimics the effect of 17β-E2 at the same concentration. The existence of a membrane receptor is confirmed by visualization using E-HRP and by transmission laser scanning microscopy in unequivocally identified α-cells using immunostaining.

### Basis for the Opposite Effect of 17β-E2 in α- and β-Cells

The rapid effects of 17β-E2 and E-HRP on  $[Ca^{2+}]_i$  are mimicked by 8Br-cGMP and blocked in more than 50% of the cases with the PKG inhibitor KT5823. These experiments indicate the involvement of cGMP in the 17β-E2 response. We have recently demonstrated in β-cells (20) that physiological levels of 17β-E2, as those used here, decrease  $K_{ATP}$  channel activity via a cGMP-dependent phosphorylation process. This produces a depolarization of the membrane and the subsequent opening of voltage-gated calcium channels, causing a potentiation of glucose-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations. A similar mechanism may operate in pancreatic α-cells, where the existence of  $K_{ATP}$  channels has recently been described (14). The  $K_{ATP}$  channel has the same function in both α- and β-cells, and depolarization of the membrane as a result of glucose metabolism is observed in both types of cells. The opposite effect of glucose is explained as a consequence of the different set of ion channels presented by α- and β-cells (14). The model predicts that



**Fig. 7.** Pharmacological Profile of the Nonclassical Estrogen Membrane Receptor

A, Competition of E-HRP binding by the catecholamines dopamine (Dop), norepinephrine (NE), and epinephrine (E) in  $\alpha$ -cells (■). Similar results were obtained in  $\beta$ -cells (□). B, Lack of competition with ligands for the  $\alpha$ -adrenergic receptor (clonidine, Clo),  $\beta$ -adrenergic receptor (propranolol, Prop), and dopamine receptor (quinpirole, Quin) in both  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells. All reactives were used at 30  $\mu$ M. Background binding obtained with 100 nM peroxidase has been subtracted. Data are from at least three duplicate experiments, expressed as mean  $\pm$  SEM.

action potential firing in  $\alpha$ -cells is only possible in a narrow window of  $K_{ATP}$  channel activity. Within this window the membrane potential can pass from being positive enough to open pacemaker ion channels (likely T-type  $Ca^{2+}$  channels) and at the same time being sufficiently negative to prevent voltage-dependent inactivation of the membrane conductances involved in action potential generation. The effect of  $17\beta$ -E2 observed here is similar to that of glucose (7), in both  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells: E2 will increase cGMP, inducing PKG activation and the subsequent decrease of  $K_{ATP}$  activity. The latter will depolarize the membrane in both types of cells: in  $\beta$ -cells depolarization will lead to  $[Ca^{2+}]_i$  potentiation as explained previously, whereas in  $\alpha$ -cells the depolarization will inactivate the membrane conductances, inducing the abolishment of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations. In this manner a common second messenger will cause opposite effects by using the same molecular mechanism. The fact that there exists

a common second messenger in both types of cells also suggests that the ER involved would be the same.

### Characteristics of the Membrane ER Involved

Two different hypotheses have been established for steroid receptors with ligand specificity involved: a classical steroid nuclear receptor and a nonclassical steroid receptor (25). The existence of proteins on the plasma membrane that cross-react with antibodies raised against different domains of the classical ER, ER $\alpha$ , has been described (26, 41). As a result, the membrane receptor involved should be very similar in structure to ER $\alpha$ . Recently, it has been shown that both ER $\alpha$  and ER $\beta$  can be expressed on the plasma membrane, but only at a 2–3% density, compared with the nuclear receptor density. Once these receptors have been activated by  $17\beta$ -E2, they stimulate adenylate cyclase as well as IP $_3$  formation via a previous activation of G proteins, G $\alpha_q$  and G $\alpha_s$ . These experiments have been performed in Chinese hamster ovary cells transiently transfected with cDNA for both ER $\alpha$  and ER $\beta$ . This study shows that the membrane and the nuclear protein are from the same transcript and have the same molecular weight (27).

Other evidence of the involvement of the classical ERs in rapid signaling is based on the inhibition of the E2 effect by antiestrogens. ICI 182,780 is a specific antiestrogen for ER $\alpha$  and  $\beta$  that inhibits the activation of the nitric oxide intracellular pathway by E2 (42, 43). It also blocks the MAPKs pathway activated by E2 in endothelial cells (44). Moreover, the E2 activation of endothelial nitric oxide synthase is enhanced by the overexpression of ER $\alpha$  in endothelial cells and inhibited by ICI (45).

The existence of the estrogen membrane receptor with a molecular structure related to a classical nuclear receptor does not exclude the existence of a specific nonclassical ER. Mounting evidence has appeared in the last years supporting this hypothesis (46). A strong indication is the fact that  $17\beta$ -E2 affects neuronal excitability in ER $\alpha$  knockout mice. The possibility that ER $\beta$  is responsible for this  $17\beta$ -E2 action is ruled out by the absence of effect of the specific antiestrogen ICI 182780 (28). Likewise,  $17\beta$ -E2 produces rapid effects in cell lines that lack both ER $\alpha$  and ER $\beta$  (47).

The absence of effect of the antiestrogens tamoxifen and ICI 182,780 in  $17\beta$ -E2-induced rapid effects also supports the existence of a nonclassical ER.  $17\beta$ -E2 acutely regulates  $Cl^-$  secretion in distal colonic epithelium in a tamoxifen-independent manner (48). In addition, ICI 182,780 does not affect rapid  $17\beta$ -E2 actions in dopaminergic neurons (49) and activation of MAPK in neuroblastoma cells (50) and hypothalamus (51). Very recently, new effects via a membrane ER unrelated to the classical have been demonstrated in pancreatic  $\beta$ -cells (31) and in mouse IC-21 macrophages (32). In these two studies antibod-

ies against classical nuclear ER failed to stain the plasma membrane.

In pancreatic  $\beta$ -cells, we have demonstrated that neither of the two classical nuclear ERs are present at the membrane, and therefore they could not be responsible for the rapid actions of  $17\beta$ -E2 (31). In addition, we demonstrate in the present paper that regulation of  $[Ca^{2+}]_i$  by  $17\beta$ -E2 is not modified by the antiestrogen ICI 182,780 in either  $\alpha$ - or  $\beta$ -cells. Moreover, no competition for E-HRP binding is manifested by the antiestrogens tamoxifen and ICI 182,780, as well as the antibody H222 against the ligand-binding domain of ER $\alpha$ . Involvement of ER $\beta$  at the membrane is also unlikely based on the pharmacological profile of the receptor described here, although no antibody against the ligand binding domain of ER $\beta$  is available to perform a competition study to fully rule out this possibility.

The binding studies presented in this paper demonstrate that the membrane receptor acting in  $\alpha$ -cells has the same pharmacological profile as that described in  $\beta$ -cells (31), *i.e.* it has a binding site shared by the hormone  $17\beta$ -E2 and the neurotransmitters, dopamine, epinephrine, and norepinephrine. It is, nonetheless, neither a classical adrenergic receptor nor a dopaminergic receptor, because their classical ligands are without effect on E-HRP binding. This pharmacological profile is the same manifested by the  $\gamma$ -adrenergic receptor, which is characterized by its equal activation with the neurotransmitters, epinephrine, norepinephrine and dopamine. It is affected neither by the  $\alpha$ - nor the  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist and produces activation of protein kinase G via a nitric oxide-independent guanylyl cyclase (35, 52–55).

The presence of a membrane receptor both in  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells unrelated to the classical ER $\alpha$  and ER $\beta$  is strong evidence in favor of a new class of estrogen membrane receptor.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

ICI 182,780 was a kind gift of Astra USA, Inc.-Zeneca Pharmaceuticals (Bristol, UK). Fluo-3 AM was obtained from Molecular Probes, Inc. (Leiden, The Netherlands). Propranolol, Clonidine, and Quinpirole were obtained from Tocris Neuramin (Bristol, UK). KT 5823 was from Alexis (Laufelfingen, Switzerland). Other substances were obtained from Sigma (Madrid, Spain).

### Measuring $[Ca^{2+}]_i$ in $\alpha$ and $\beta$ -Cells Within Intact Islets of Langerhans

Swiss albino OF1 male mice (8–10 wk old) were killed by cervical dislocation according to national guidelines. Pancreatic islets of Langerhans were isolated by collagenase digestion as previously described (56) and loaded with  $5 \mu\text{M}$  Fluo-3 AM for at least 1 h at room temperature. Loaded islets were kept in a medium containing (mM): 115 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 5 KCl, 1.1 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, and 2.5 HEPES;

plus 1% albumin and 5 mM D-glucose, continuously gassed with a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, pH 7.35. Islets were perfused with a modified Ringer solution containing (mM): 120 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.1 MgCl<sub>2</sub>, and 2.5 CaCl<sub>2</sub>, pH 7.35, when gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>.

Calcium records in individual cells were obtained by imaging  $[Ca^{2+}]_i$  under a LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) using a Carl Zeiss  $\times 40$  oil immersion lens, numerical aperture 1.3. Images were collected at 2-sec intervals, and fluorescent signals from individual cells were measured in function of time using the Carl Zeiss LSM software package. Experiments were performed at 34 C. Results were plotted using a commercially available software (SigmaPlot, Jandel Scientific, San Rafael, CA) where the change in fluorescence ( $\Delta F$ ) is expressed as a percentage of the basal fluorescence ( $F_0$ ) observed in absence of stimulus.  $\alpha$  and  $\beta$ -cells within the islets were identified by their  $[Ca^{2+}]_i$  oscillatory pattern in 0.5 mM and 8 mM glucose, respectively (7, 34).

### Cell Isolation and Culture

Islets isolated as above were dispersed into single cells and cultured as previously described (4). Briefly, islets were disaggregated into single cells with trypsin. Cells were then centrifuged, resuspended in cultured medium RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 200 U ml<sup>-1</sup> penicillin, 0.2 mg ml<sup>-1</sup> streptomycin, 2 mM L-glutamine and 11 mM glucose, and plated on poly-L-lysine-coated glass coverslips. Cells were kept at 37 C in a humidified atmosphere of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h.

### E2-Peroxidase Binding Assay

After 24 h in culture, the cells were washed and fixed in 4% (wt/vol) fresh paraformaldehyde for 30 sec, which does not permeabilize the cells (19), and exposed overnight to 4.5  $\mu\text{g/ml}$  E-HRP at 4 C (0.45  $\mu\text{g/ml}$  for Fig. 4). The competition for the E2 binding site was tested using various reactives while adding E-HRP simultaneously. Cells were then washed and E-HRP binding was developed using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in the presence of urea hydrogen peroxide and CoCl<sub>2</sub> for 30 min (Sigma FAST 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride with metal enhancer tablet set, Co-DAB). After the development with Co-DAB, the cells were washed three times with PBS.

### Immunocytochemistry

To identify  $\alpha$ -cells, immunocytochemistry was performed using an antiglucagon antibody. After the staining with E-HRP and Co-DAB, the cells were permeabilized with 1% Triton for 2 min. They were then incubated with the primary antibody (1:500 dilution) for 2 h, after which the secondary antibody antiumou IgG-tetramethylrhodamine isothiocyanate (1:125 dilution) was added for 1 h, both at room temperature. There was no labeling with the secondary antibody alone.

### Binding Studies Using E-HRP and Transmission Laser Scanning Microscopy

The reaction between HRP and Co-DAB produces a dark precipitate that absorbs light, permitting us to visualize it using transmission laser scanning microscopy (57). The use of a reactive that competes for the E2 binding site will decrease the amount of precipitate. To identify those reactives that bind to the same site as  $17\beta$ -E2, the light absorbed by the precipitate was measured, as previously reported (31). Nonetheless, we should note that quantifying the amount of precipitate simply by measuring the light absorbed may be an

unreliable procedure if changes in the amount of absorbed light are small. This method is of interest for comparative purpose, and it works extremely well for conditions in which the difference in the amount of precipitate is large. For that reason, detailed concentration-response profiles have been omitted. Transmission photographs were taken with a Carl Zeiss LSM 510 laser scanning confocal microscope, at 543 nm. In this work, the light intensity was taken from the whole area of the cell using Carl Zeiss LSM 510 software, rather than along a line as we have previously reported (31). A similar area was chosen to measure the background light. The background light and the microscope settings were constant throughout the different experiments. The quantity of E-HRP bound is expressed as the percentage of absorbed light with respect to the control condition. The lower the percentage of absorbed light, the higher the competition for an E-HRP binding site. To obtain an appropriate staining background, incubation and developmental procedure with peroxidase were performed in identical conditions. This background light has been subtracted in Figs. 6 and 7 for clarity.

### Acknowledgments

The authors thank Drs. Esther Fuentes and Cristina Ripoll for their help in several aspects of the project and E. Pérez García, A. Pérez Vegara, and N. Illera (Miguel Hernandez University, Alicante, Spain) for technical assistance. H222 antibody was a kind gift of Professor G. Greene (University of Chicago, Chicago, IL).

Received May 23, 2001. Accepted November 7, 2001.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Angel Nadal, Institute of Bioengineering and Department of Physiology, School of Medicine, Miguel Hernández University, San Juan Campus Carretera Alicante-Valencia Km 87. 03550, Alicante, Spain. E-mail: nadal@umh.es.

This work was supported by Grants from European Union-Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (IFD97-1064-103-02) and Fundación Navarro Trípodi. A.B.R. is a recipient of a research scholarship from de Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

### REFERENCES

- Johansson H, Gylfe E, Hellman B 1987 The actions of arginine and glucose on glucagon secretion are mediated by opposite effects on cytoplasmic  $Ca^{2+}$ . *Biochem Biophys Res Commun* 147:309–314
- Prentki M, Matschinsky FM 1987  $Ca^{2+}$ , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* 67:1185–1248
- Ashcroft FM, Rorsman P 1989 Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54:87–143
- Valdeolmillos M, Nadal A, Contreras D, Soria B 1992 The relationship between glucose-induced  $K^{+}_{ATP}$  channel closure and the rise in  $[Ca^{2+}]_i$  in single mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *J Physiol (Lond)* 455:173–186
- Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M 1991 Widespread synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* 418:417–422
- Valdeolmillos M, Nadal A, Soria B, Garcia-Sancho J 1993 Fluorescence digital image analysis of glucose-induced  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes* 42:1210–1214
- Nadal A, Quesada I, Soria B 1999 Homologous and heterologous asynchronicity between identified  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\delta$ -cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol (Lond)* 517:85–93
- Rosario LM, Atwater I, Scott AM 1986 Pulsatile insulin release and electrical activity from single ob/ob mouse islets of Langerhans. *Adv Exp Med Biol* 211:413–425
- Martin F, Reig JA, Soria B 1995 Secretagogue-induced  $[Ca^{2+}]_i$  changes in single rat pancreatic islets and correlation with simultaneously measured insulin release. *J Mol Endocrinol* 15:177–185
- Barbosa RM, Silva AM, Tome AR, Stamford JA, Santos RM, Rosario LM 1998 Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J Physiol (Lond)* 510:135–143
- Dunbar JC, Walsh MF 1982 Glucagon and insulin secretion by dispersed islet cells: possible paracrine relationships. *Horm Res* 16:257–267
- Opara EC, Atwater I, Go VL 1988 Characterization and control of pulsatile secretion of insulin and glucagon. *Pancreas* 3:484–487
- Rorsman P, Hellman B 1988 Voltage-activated currents in guinea pig pancreatic  $\alpha$  2 cells. Evidence for  $Ca^{2+}$ -dependent action potentials. *J Gen Physiol* 91:223–242
- Gopel SO, Kanno T, Barg S, Weng X, Gromada J, Rorsman P 2000 Regulation of glucagon release in mouse-cells by  $K_{ATP}$  channels and inactivation of TTX-sensitive  $Na^{+}$  channels. *J Physiol* 528:509–520
- Berts A, Ball A, Gylfe E, Hellman B 1996 Suppression of  $Ca^{2+}$  oscillations in glucagon-producing  $\alpha$ 2-cells by insulin/glucose and amino acids. *Biochim Biophys Acta* 1310:212–216
- Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Barg S, Buschard K, Renstrom E, Rorsman P 1997 Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the  $Ca^{2+}$  current and the number of granules close to the L-type  $Ca^{2+}$  channels. *J Gen Physiol* 110:217–228
- SutterDub MT 1976 Preliminary report: effects of female sex hormones on insulin secretion by the perfused rat pancreas. *J Physiol (Paris)* 72:795–800
- Faure A, Haouari M, Sutter BC 1988 Short term and direct influence of oestradiol on glucagon secretion stimulated by arginine. *Diabet Metab* 14:452–454
- Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C, Soria B 1998 Rapid insulinotropic effect of  $17\beta$ -estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J* 12:1341–1348
- Ropero AB, Fuentes E, Rovira JM, Ripoll C, Soria B, Nadal A 1999 Non-genomic actions of  $17\beta$ -oestradiol in mouse pancreatic  $\beta$ -cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *J Physiol (Lond)* 521:397–407
- Kelly MJ, Wagner EJ 1999 Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* 10:369–374
- Kelly MJ, Levin ER 2001 Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 12:152–156
- Nadal A, Diaz M, Valverde MA 2001 The estrogen trinity: membrane, cytosolic and nuclear effects. *News Physiol Sci* 16:251–255
- Wehling M 1997 Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 59:365–393
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M 2000 Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52:513–556
- Watson CS, Campbell CH, Gametchu B 1999 Membrane oestrogen receptors on rat pituitary tumour cells: immunoidentification and responses to oestradiol and xenoestrogens. *Exp Physiol* 84:1013–1022
- Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER 1999 Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER $\alpha$  and ER $\beta$  expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13:307–319



28. Gu Q, Korach KS, Moss RL 1999 Rapid action of 17 $\beta$ -estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. *Endocrinology* 140:660–666
29. Das SK, Taylor JA, Korach KS, Paria BC, Dey SK, Lubahn DB 1997 Estrogenic responses in estrogen receptor- $\alpha$  deficient mice reveal a distinct estrogen signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12786–12791
30. Toran-Allerand CD 2000 Novel sites and mechanisms of oestrogen action in the brain. In: Chadwick DJ, Goode JA, eds. *Neuronal and cognitive effects of oestrogens*. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons; 56–69; discussion 69–73
31. Nadal A, Ropero AB, Laribi O, Maillet M, Fuentes E, Soria B 2000 Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11603–11608
32. Benten WP, Stephan C, Lieberherr M, Wunderlich F 2001 Estradiol signaling via sequesterable surface receptors. *Endocrinology* 142:1669–1677
33. Nadal A, Soria B 2000 Imaging intracellular calcium in living tissue by laser-scanning confocal microscopy. In: Pochet R, ed. *Calcium: the molecular basis of calcium action in biology and medicine*. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers; 661–671
34. Quesada I, Nadal A, Soria B 1999 Different effects of tolbutamide and diazoxide in  $\alpha$ ,  $\beta$ -, and  $\delta$ -cells within intact islets of Langerhans. *Diabetes* 48:2390–2397
35. Hirst GD, Neild TO, Silverberg GD 1982 Noradrenaline receptors on the rat basilar artery. *J Physiol (Lond)* 328:351–360
36. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Picard C, Flament-Durand J 1969 Effects of pregnancy and chorionic growth hormone upon insulin secretion. *Endocrinology* 84:41–44
37. Costrini NV, Kalkhoff RK 1971 Relative effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion. *J Clin Invest* 50:992–999
38. Sutter-Dub MT 1979 Effects of pregnancy and progesterone and/or oestradiol on the insulin secretion and pancreatic insulin content in the perfused rat pancreas. *Diabetes Metab* 5:47–56
39. Stevenson JC, Crook D, Godsland IF, Collins P, Whitehead MI 1994 Hormone replacement therapy and the cardiovascular system. Nonlipid effects. *Drugs* 47(Suppl 2):35–41
40. Brussaard HE, Gevers Leuven JA, Frolich M, Klufft C, Krans HM 1997 Short-term oestrogen replacement therapy improves insulin resistance, lipids and fibrinolysis in postmenopausal women with NIDDM. *Diabetologia* 40:843–849
41. Pappas TC, Gametchu B, Watson CS 1995 Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 9:404–410
42. Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I 1999 Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor  $\alpha$  localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 263:257–262
43. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR 2000 Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* 87:677–682
44. Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR 2000 Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5930–5935
45. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW 1999 Estrogen receptor  $\alpha$  mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103:401–406
46. Nadal A, Ropero AB, Fuentes E, Soria B 2001 The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear? *Trends Pharmacol Sci* 22:597–599
47. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton Jr AR 2000 Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14:1649–1460
48. Condliffe SB, Doolan CM, Harvey BJ 2001 17 $\beta$ -Oestradiol acutely regulates Cl $^-$  secretion in rat distal colonic epithelium. *J Physiol* 530:47–54
49. Beyer C, Karolczak M 2000 Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signalling. *J Neurosci Res* 59:107–116
50. Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM 1997 Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen-activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138:4030–4033
51. Kuroki Y, Fukushima K, Kanda Y, Mizuno K, Watanabe Y 2000 Putative membrane-bound estrogen receptors possibly stimulate mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 400:205–209
52. Hirst GD, Neild TO 1980 Evidence for two populations of excitatory receptors for noradrenaline on arteriolar smooth muscle. *Nature* 283:767–768
53. Benham CD, Tsien RW 1988 Noradrenaline modulation of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery. *J Physiol (Lond)* 404:767–784
54. Yawo H 1996 Noradrenaline modulates transmitter release by enhancing the Ca $^{2+}$  sensitivity of exocytosis in the chick ciliary presynaptic terminal. *J Physiol (Lond)* 493:385–391
55. Yawo H 1999 Involvement of cGMP-dependent protein kinase in adrenergic potentiation of transmitter release from the calyx-type presynaptic terminal. *J Neurosci* 19:5293–5300
56. Nadal A, Valdeolmillos M, Soria B 1994 Metabolic regulation of intracellular calcium concentration in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Am J Physiol* 267:E769–E774
57. Halbhauer KJ, Krieg R, Konig K 1998 Laser scanning microscopy in enzyme histochemistry. Visualization of cerium-based and DAB-based primary reaction products of phosphatases, oxidases and peroxidases by reflectance and transmission laser scanning microscopy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44:807–826