

1
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA/INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMEDICAS

"PRODUCCION DE FOSFATOS DE INOSITOL EN RESPUESTA A
HISTAMINA EN LA LINEA NEURONAL HIPOTALAMICA
GT1-1"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A

DIRK HOL SOTO BORJA

ASESOR: DOCTOR GONZALO MARTINEZ DE LA ESCALERA

MEXICO, D.F. SEPTIEMBRE DE 1994.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Luctor et emergo

DEDICATORIA

A Ignacio y Carmelita Soto Borja, por su constante apoyo y respaldo a través de los años, por el tiempo que me han dedicado, por sus invaluable consejos, y por su cariño. A ellos quiero expresar mi gratitud y cariño más profundos.

A Gonzalo Martínez de la Escalera, por ayudarme a crecer dentro y fuera de las puertas del laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, sin más palabras, con toda mi gratitud y mi amor.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Gonzalo Martínez de la Escalera y Carmen Clapp, de todo corazón por tanto apoyo, enseñanzas y oportunidades que me han brindado.

Al doctor Gilles Guillon, de la Universidad de Montpellier, por enseñarme a medir los fosfatos de inositol.

Al doctor Richard Weiner, de la Universidad de California, San Francisco, por la donación de células GT1.

A los doctores Carlos Arámburo, Marcia Hiriart, Ana María López Colomé y Alejandro Zentella, por sus valiosos comentarios acerca de este trabajo.

A todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio, les expreso mi agradecimiento más sincero por compartir su tiempo conmigo.

Al señor Roberto Nájera, por su apoyo logístico y sus agradables conversaciones.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, por el apoyo económico que recibí por mucho tiempo.

Al personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas y del Centro de Neurobiología, por todos sus servicios.

Finalmente, quiero agradecer con todo mi corazón a Tere, a Azul, a Karel, a todos mis amigos y al resto de mi familia por haberme acompañado tanto en momentos difíciles, y ayudarme a recuperar la fe en el futuro. Gracias por la Esperanza.

INDICE

	Página
Indice.....	1
Lista de abreviaciones.....	4
I-Resumen.....	6
II-Introducción.....	8
2.1-Neuroendocrinología de la reproducción.....	8
-Eje hipotálamo - hipófisis - gónadas.....	8
+)El hipotálamo.....	9
++)Neuronas GnRHérgicas: su origen, distribución y conexiones.....	10
++)Regulación de la biosíntesis y secreción de GnRH.....	12
+)La hipófisis.....	15
++)Hipófisis anterior.....	15
++)Hipófisis posterior.....	16
++)Gonadotropos: producción de LH y FSH.....	16
+)Gónadas: Regulación de funciones reproductivas y esteroidogénesis.....	18
-Integración: el ciclo ovárico.....	19
2.2-Transducción de señales celulares: AMP cíclico e hidrólisis de fosfoinosítidos.....	24
-Consideraciones generales sobre la transducción de señales y los segundos mensajeros: el caso del AMP cíclico.....	24
-Hidrólisis de fosfoinosítidos.....	25
+)Panorama general.....	25
+)Estructura y metabolismo de los fosfoinosítidos.....	27
+)Generación de fosfatos de inositol y diacilglicerol.....	27
+)Fosfolipasa C, proteínas que se unen a GTP, y receptores acoplados a la fosfolipasa C.....	29
+)Acciones del inositol 1,4,5 trisfosfato y del diacilglicerol.....	31
+)Acciones del Ca ²⁺ y de la cinasa C de proteínas.....	32
-Hidrólisis de fosfoinosítidos en el sistema nervioso.....	35

2.3-Control neuroendócrino de las funciones reproductivas: papeles de distintos neuromediadores en general, y de la histamina en particular, en la regulación de la secreción de GnRH por el hipotálamo.....	37
-Consideraciones generales sobre la secreción de GnRH.....	37
+)Importancia de la pulsatilidad de la secreción de GnRH.....	37
+)El "generador de pulsos" de GnRH.....	38
+)Propiedades intrínsecas de la secreción de GnRH.....	41
-Control neuroendócrino de las funciones reproductivas.....	42
+)Neuromediadores peptídicos.....	42
++)Péptidos opioides.....	43
+)Esteroides sexuales.....	46
+)Monoaminas y otros neurotransmisores.....	48
+)Histamina.....	56
++)Consideraciones generales.....	56
++)Neurobiología de la histamina.....	62
++)Participación de la histamina en el control de mecanismos neuroendócrinos.....	63
2.4-Las líneas neuronales GT1.....	68
-Origen y desarrollo.....	68
-Utilidad e importancia.....	70
III-Planteamiento del problema.....	71
IV-Material y métodos.....	77
-Cultivo celular.....	77
-Preparación de cultivos primarios de adenohipófisis.....	78
-Medición de fosfatos de inositol por cromatografía de intercambio aniónico.....	79
-Diseño experimental.....	83
-Estadística.....	84
V-Resultados.....	85
-Incrementos en los niveles de fosfatos de inositol como respuesta a la aplicación de TRH a células adenohipofisiarias en cultivo: validación	

de la técnica.....	85
-Producción de fosatos de inositol en respuesta a HA en las células GT1-1: respuesta a diferentes concentraciones de histamina, y curso temporal del efecto.....	87
-Efecto de agonistas H1, H2 y H3 histaminérgicos sobre la producción de fosatos de inositol en la línea GT1-1.....	91
-Efecto de antagonistas H1, H2 y H3 histaminérgicos sobre la producción de fosatos de inositol en las células GT1-1.....	93
VI-Discusión.....	99
VII-Conclusiones.....	105
VIII-Bibliografía.....	106

Lista de abreviaciones.

ACTH: hormona adrenocorticotrópica ó corticotropina (*adrenocorticotropic hormone*)

alfa-MH: alfa-metilhistamina

alfa-MSH: hormona alfa estimuladora de melanocitos (*alfa melanocyte-stimulating hormone*)

AMPA: ácido 2-amino 3-hidroxi 5-metil 4-isoxazol propiónico

beta-END: beta-endorfina

beta-LPH: beta-lipotropina

bp: pares de bases

[Ca²⁺]_i: concentración intracelular de Ca²⁺

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina

cGMP: monofosfato cíclico de guanosina

CRH: hormona liberadora de corticotropina ó corticoliberina (*corticotropin-releasing hormone*)

DA: dopamina

DAG: diacilglicerol

E: epinefrina ó adrenalina

EEM: error estándar de la media

ERE: elemento responsivo a estrógenos (*estrogen responsive element*)

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*)

FSH: hormona estimuladora del folículo (*follicle-stimulating hormone*)

GABA: ácido gamma-aminobutírico (*gamma-aminobutyric acid*)

GAP: péptido asociado a GnRH (*GnRH-associated peptide*)

GH: hormona de crecimiento (*growth hormone*)

GHRH: hormona liberadora de la hormona de crecimiento ó somatoliberina (*growth hormone-releasing hormone*)

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas (*gonadotropin-releasing hormone*), también conocida como LHRH ó gonadoliberina

HA: histamina

5-HT: 5-hidroxitriptamina ó serotonina.

icv: intracerebroventricularmente

Ins1,3,4P3: inositol 1,3,4 trisfosfato

Ins1,3,4,5P4: inositol 1,3,4,5 tetraquisfosfato

Ins1,4,5P3: inositol 1,4,5 trisfosfato

IP3R: receptor de Ins1,4,5P3

IP1: inositol monofosfato

IP2: inositol bisfosfato

IP3: inositol trisfosfato

IP4: inositol tetraquisfosfato

IPx: fosfatos de inositol (*inositol phosphates*)

L-AP4: ácido 4-aminofosfobutírico

L-Glu: ácido L-glutámico (glutamato)

LH: hormona luteinizante (*luteinizing hormone*)

LHRH: hormona liberadora de hormona luteinizante (*luteinizing hormone-releasing hormone*), también conocida como GnRH ó gonadolibarina

NE: norepinefrina ó noradrenalina

NGF: factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor*)

NMDA: ácido N-metil D-aspártico

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*)

PKC: cinasa C de proteínas (*protein kinase C*)

PLC: fosfolipasa C (*phospholipase C*)

POMC: proopiomelanocortina

PRL: prolactina

SNC: sistema nervioso central

2-TEA: 2-tiazoliletilamina

trans-ACPD: ácido trans-aminociclopentil 1,1,3-dicarboxílico

TRH: hormona liberadora de tirotrópina ó tirolibarina (*thyrotropin-releasing hormone*)

TSH: hormona estimuladora de la tiroides ó tirotrópina (*thyroid-stimulating hormone*)

VIP: péptido intestinal vasoactivo (*vasoactive intestinal peptide*)

I - Resumen.

Las funciones reproductivas en los mamíferos aparentemente están reguladas por el SNC. En esta regulación interviene la comunicación neuroendócrina entre el hipotálamo y la hipófisis. Algunas células presentes en la hipófisis liberan LH y FSH a la circulación sistémica en respuesta al decapeptido GnRH. En el hipotálamo, existen neuronas neuroendócrinas que son capaces de liberar GnRH a la circulación del sistema porta hipofisiario en respuesta a estímulos nerviosos, como potenciales de acción (ver Knobil, 1992). Estas células, llamadas neuronas GnRHérgicas, representan la vía final común por medio de la cual se controla la secreción de LH (Clark y Cummins, 1982). La LH y FSH actúan a su vez sobre las gónadas, donde regulan distintos procesos relacionados con la reproducción.

Se ha demostrado que una gran variedad de neuromediadores intervienen en la regulación de la secreción de GnRH (ver Weiner et al., 1988; Levine et al., 1990); entre éstos se encuentra la HA (ver Weiner et al., 1988; Knigge y Warberg, 1991; Donoso y Álvarez, 1984). Las regulaciones ejercidas por estos neuromediadores son generalmente difíciles de estudiar; esto se debe al pequeño número y localización altamente difusa de las neuronas GnRHérgicas (ver Weiner et al., 1988; y Silverman, 1988). Estas características hacen difícil establecer si los efectos de los distintos neuromediadores estudiados son directos y específicos, ó si son mediados por interneuronas, ó si son inespecíficos.

Con el objeto de contar con un modelo experimental con el cual esclarecer estas cuestiones, el grupo de Mellon et al. (1990) desarrolló tres líneas neuronales a partir de neuronas GnRHérgicas por medio de tumorigénesis genéticamente dirigida. Estas líneas, llamadas GT1-1, GT1-3, y GT1-7, presentan fenotipo neuronal y secretan GnRH en respuesta a la despolarización de la membrana. Estas líneas representan un modelo en el cual estudiar diversos aspectos de la biología de las neuronas GnRHérgicas, además de distintos aspectos de la regulación que sobre la secreción de éstas ejercen distintos neuromediadores.

La HA estimula la secreción de GnRH por el hipotálamo mediobasal de rata (Miyake et al., 1987); este efecto parece estar mediado por receptores H1. Sin embargo, en esos estudios no se pudo esclarecer si el efecto es directo, ó si está mediado por

interneuronas. Con el objeto de aclarar esa situación y de identificar, en su caso, al tipo de receptor y a los mecanismos de comunicación intracelular participantes, probamos en el laboratorio el efecto de la HA sobre la secreción de GnRH, y sobre la producción de IPx en la línea neuronal GT1-1. Resultados del laboratorio indican que la HA sí estimula directamente la secreción de GnRH en esta línea celular.

En el presente trabajo encontramos que la HA estimula la producción de IPx en la línea GT1-1. Este efecto es dependiente del tiempo y de la concentración de HA. La 2-TEA (agonista H1), mas no el dimaprit ni la alfa-MH (agonistas H2 y H3, respectivamente), es capaz de provocar un incremento en los niveles de IPx. Por otro lado, la pirilamina, la triprolidina y la clorfeniramina (antagonistas H1) bloquean el efecto estimulador de la HA sobre la producción de IPx, mientras que ni la ranitidna (antagonista H2) ni la tioperamida (antagonista H3) bloquean dicho efecto.

Los resultados del laboratorio y los del presente trabajo, tomados en conjunto, sugieren que la HA tiene un efecto directo sobre la secreción de GnRH por la línea neuronal GT1-1, y que éste efecto está mediado por receptores H1 acoplados a la producción de IPx.

Lo anterior, aunado a los hallazgos de Miyake et al. (1987), sugieren que la regulación de la secreción de GnRH por HA in vivo podría ejercerse de manera similar a como parece llevarse a cabo in vitro. Sin embargo, es preciso tener cautela con respecto a la generalización e interpretación de hallazgos hechos con las células GT1. Estas células son neuronas transformadas descendientes de un tumor, por lo que quizá no reflejen fielmente la naturaleza de las células de las que fueron derivadas.

II- Introducción.

2.1- Neuroendocrinología de la reproducción.

-Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

En esta primera sección discutiremos algunos aspectos relacionados con el funcionamiento y regulación del así llamado eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Este eje participa en la regulación de procesos gonadales que hacen posible la reproducción.

En el hipotálamo se sintetiza y secreta GnRH (también conocido como LHRH), un decapeptido que actúa sobre células hipofisarias a las que estimula a producir gonadotropinas (LH y FSH). Las gonadotropinas viajan por la circulación sistémica y finalmente interactúan con sus células blanco en las gónadas. Las gonadotropinas regulan distintas funciones gonadales, como la gametogénesis y la producción de hormonas esteroideas sexuales. El eje participa además en el control de varios eventos fisiológicos tales como la maduración de las gónadas, el inicio de la pubertad, la regulación de la ovulación, etc.

Este eje está regulado, además de por otros tipos de control, por retroalimentación positiva y negativa. Por ejemplo, los esteroideas sexuales modulan la respuesta de la hipófisis a GnRH, y participan en el control de la secreción de esta hormona en el hipotálamo (retroalimentación de asa larga). Niveles altos de LH y FSH en sangre posiblemente inhiban la secreción de GnRH (retroalimentación de asa corta), y quizá una tasa elevada de síntesis y producción de GnRH autoinhiba su propio metabolismo (retroalimentación de asa ultracorta). Aparte de las regulaciones mencionadas, el eje es también susceptible de ser regulado por diversas señales, como por ejemplo la insulina u hormonas tiroideas, relacionadas con otros aspectos fisiológicos del animal.

A continuación se describirán con mayor detalle los distintos componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

+)El hipotálamo.

El hipotálamo es una región relativamente pequeña pero inmensamente compleja del diencefalo, que se extiende desde la lámina terminal hasta un plano vertical inmediatamente caudal a los cuerpos mamilares, y dorsoventralmente, desde el surco hipotalámico para incluir las estructuras situadas en la pared y piso del III ventrículo.

El hipotálamo está compuesto por distintas poblaciones de neuronas. Algunas de ellas se agrupan en núcleos, algunos más claramente definidos que otros. Algunas regiones de esta zona están atravesadas por una compleja serie de interconexiones e hileras de fibras difusas que entran, salen, pasan a través de, ó son intrínsecas a la región. El hipotálamo se puede dividir, a grandes líneas, en tres zonas:

-La zona periventricular, que consta de parte del núcleo preóptico, del núcleo supraquiasmático, del núcleo paraventricular, y de los núcleos infundibular y posterior del hipotálamo.

-La zona intermedia, que consta de parte del núcleo preóptico, del núcleo anterior, del dorsomedial y ventromedial, y de pequeños núcleos premamilares.

-La zona lateral, que consta de porciones del núcleo preóptico, del núcleo supraóptico, del núcleo lateral, del núcleo tuberomamilar, y de los núcleos tuberoslaterales.

Además de otras funciones, el hipotálamo participa en el control de la hipófisis y sus secreciones hormonales, entre ellas la de gonadotropinas, así como en el de la secreción de oxitocina y vasopresina. Este control se lleva a cabo por medio de las neuronas neuroendócrinas y de la neurosecreción. La hipófisis, a su vez, regula un gran número de funciones corporales por medio de las hormonas que secreta.

Las neuronas neuroendócrinas presentan fenotipo neuronal, además de lo cual se parecen a las células endócrinas en cuanto a que sintetizan y secretan a la circulación mensajeros químicos; éstos no siempre pertenecen a la definición clásica de neurotransmisores. La importancia de estas neuronas, comparadas con otras, radica en el hecho de que pueden secretar a la sangre mensajeros químicos en respuesta a una señal eléctrica, como lo son los potenciales de acción. De esta manera, actúan como una interfase directa entre el sistema nervioso y el endócrino: la actividad nerviosa de las células se traduce en actividad endócrina.

Muchas otras células endócrinas, de naturaleza no neural, también liberan sus contenidos en respuesta a estímulos eléctricos.

Algunas de estas células mandan proyecciones hacia la hipófisis posterior ó neurohipófisis, mientras que otras proyectan hacia otras zonas y hacia una protuberancia del hipotálamo llamada eminencia media. En la eminencia media hay una gran abundancia de vasos capilares fenestrados integrantes del sistema porta hipofisiario; es en esta zona donde los axones de las neuronas neurosecretoras liberan sus contenidos al sistema porta en respuesta a estímulos eléctricos.

Otros tipos de células neuroendócrinas secretan a la sangre sustancias que actúan directamente sobre órganos periféricos. Tal es el caso de la neurohipófisis, en la que una serie de axones provenientes del hipotálamo secretan directamente oxitocina y vasopresina, quizá entre otros productos, a la circulación.

Las neuronas neuroendócrinas que sintetizan y secretan GnRH a la circulación porta, son conocidas como neuronas GnRHérgicas. Algunos aspectos relacionados con ellas se discutirán a continuación.

++)Neuronas GnRHérgicas: su origen, distribución y conexiones.

+++) Origen.

Las neuronas con capacidad de sintetizar y secretar GnRH tienen su origen embrionario en la placa olfatoria del animal y de ahí migran hacia la base del cerebro anterior. En el ratón fetal, las neuronas GnRHérgicas se diferencian en la placa olfatoria en el día E11 ó inmediatamente después, y muchas de ellas llegan al, ó cerca del, área preóptica alrededor de los días E16-20 (Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989). Al parecer, este fenómeno no es exclusivo del ratón (Pfaff et al., 1990), y es probable que en el hombre ocurra de la misma manera. Estas observaciones han llevado a postular hipótesis acerca del significado evolutivo del origen embrionario de estas células: existe la posibilidad de que, en organismos primitivos, la información olfatoria regulara directamente las funciones reproductivas.

+++) Distribución.

En todas las especies de mamíferos estudiados en detalle, se pueden identificar distintas subpoblaciones de neuronas GnRHérgicas dentro del SNC. Las neuronas GnRHérgicas no se observan agrupadas en núcleos, sino que más bien aparecen como

integrantes de redes neuronales difusas que se extienden a través de varias estructuras citoarquitectónicas definidas clásicamente.

La red más prominente, que es la que con mayor probabilidad contribuye a la regulación de la secreción de gonadotropinas, se compone de neuronas que forman un continuo difuso. Ésta se extiende desde la banda diagonal de Broca en el telencéfalo, a la que comprende, hacia núcleos septales más dorsales, entre los que se encuentran los núcleos septales medial y triangular; este continuo también se extiende hacia la stria terminalis, y hacia las áreas diencefálicas, que incluyen las áreas preópticas periventricular, medial y lateral. La red alcanza algunas áreas del hipotálamo anterior, y la zona retroquiasmática. Dentro de este continuo hay grupos ó agregaciones de células que yacen dorsalmente con relación al núcleo supraóptico, y a veces dentro de él. También es posible encontrar grupos de estas células en el hipotálamo lateral (Silverman, 1988).

Al parecer, existen diferencias especie-específicas relacionadas con la presencia ó ausencia de neuronas GnRHérgicas en el hipotálamo mediobasal, en el que se encuentra el núcleo arcuato. En la rata están aparentemente ausentes, mientras que lo contrario ocurre en el hombre. En el ratón es posible encontrar, dentro de esa área, un pequeño número de estas células (Silverman, 1988).

+++) Conexiones:

La principal proyección de este laxo continuo tele-diencefálico de neuronas GnRHérgicas se dirige hacia la eminencia media. Las fibras GnRHérgicas llegan a esta zona por más de una ruta; la principal es la vía septo-preóptica-infundibular, común a la mayoría de las especies estudiadas (Silverman, 1988). Ésta es un haz de fibras, que se origina a partir de componentes septales, que se comienza a definir al nivel de la banda diagonal de Broca.

En aquellas especies que contienen neuronas GnRHérgicas en el núcleo arcuato, se observan axones que se extienden desde dichas células hasta la eminencia media. Algunos de éstos inclusive se extienden por el tallo infundibular para entrar a la neurohipófisis. Entre 50 y 60% de las neuronas GnRHérgicas en las áreas septal, preóptica e hipotalámica contribuyen a la proyección hacia la eminencia media (Silverman, 1988).

Además de la proyección hacia la eminencia media, existen proyecciones hacia otros sitios del SNC, como el órgano vasculoso de la lámina terminal. La participación de esta estructura en la regulación de la secreción de gonadotropinas es controversial (Silverman, 1988). Las neuronas GnRHérgicas también proyectan hacia otras regiones extrahipotalámicas tales como el órgano subfornical, la stria medullaris, y la amígdala medial; algunas fibras llegan hasta el área tegmental ventral del cerebro medio. Además, algunas neuronas GnRHérgicas se encuentran asociadas, como es de esperar, con estructuras olfativas, tales como el nervus terminalis, los bulbos olfatorios, etc. (Ibid.).

Las neuronas GnRHérgicas reciben aferencias de otras neuronas y probablemente están asociadas con terminales que contienen DA, NE, y E. Además, estas células posiblemente estén en contacto con terminales que contienen 5-HT, neurotensina, neuropéptido Y, péptidos opioides, endotelina, y sustancia P. Se ha demostrado la existencia de contactos sinápticos entre neuronas GnRHérgicas y células que contienen descarboxilasa del ácido glutámico -y muy probablemente GABA-, en el área preóptica (Leranth et al., 1985). Las neuronas GnRHérgicas también forman contactos sinápticos entre sí, y con otras neuronas.

La GnRH puede tener un papel como neurotransmisor ó como neuromodulador, ya que inyecciones de GnRH a ratas hipofisectomizadas, dentro de un tratamiento experimental específico, tienen el efecto de producir conducta de lordosis (ver Pfaff et al., 1990). Es posible distinguir farmacológicamente los efectos conductuales de los hipofisarios causados por el decapeptido. Esto sugiere la existencia de al menos dos tipos distintos de receptores para esta molécula, uno asociado a sus acciones centrales en el SNC, y otro a sus efectos hipofisarios (ibid).

En los roedores, muchas de las neuronas GnRHérgicas se encuentran en el área preóptica, que es una región del cerebro adyacente al hipotálamo.

++)Regulación de la biosíntesis y secreción de GnRH.

La GnRH es biosintetizada en las neuronas GnRHérgicas a partir de un precursor de mayor tamaño (Fig.1). La síntesis se inicia con la transcripción del gen que codifica para la pro-GnRH; este gen ya ha sido clonado y secuenciado (e.g. Hayflick et al.,

1989). Sin embargo, la GnRH parece sintetizarse también en otros tejidos; a este respecto, se ha encontrado mRNA de GnRH en la hipófisis anterior (Pagesy et al., 1992).

El transcrito codifica para un péptido precursor, la pro-GnRH, que tiene un peso molecular aproximado de 10 kDa. La pro-GnRH presenta en su extremo N-terminal una secuencia "líder" ó "señal", que es característica en muchas proteínas de secreción. Dicha secuencia está seguida, en dirección C-terminal, por otra secuencia de 10 aminoácidos, mismos que componen a la GnRH. Una pequeña secuencia compuesta por tres aminoácidos, Gly, Lys, y Arg, separa al extremo C-terminal de la GnRH del resto del precursor. Este último está compuesto por 56 aminoácidos, y se conoce como GAP.

Aparentemente, la pro-GnRH es procesada de varias maneras: a partir de dicho precursor, parecen generarse un número grande de productos. Parece existir también un número grande de intermediarios metabólicos en la vía por la que se genera GnRH a partir de pro-GnRH.

Con respecto a lo anterior, la secuencia de tres residuos entre la GnRH y el GAP es al parecer un sitio de procesamiento enzimático, al menos en la línea neuronal hipotalámica GT1 (Wetsel et al., 1991), que es la misma que se empleó en el presente trabajo. El resultado de este procesamiento es la generación de la GnRH y de sus intermediarios GnRH (Gly11), GnRH (Gly11, Lys12), y GnRH (Gly11, Lys12, Arg 13), además del GAP (1-56) (Wetsel et al., 1991). Las células GT1 contienen y secretan múltiples formas de la pro-GnRH.

La GnRH, ya procesada, es almacenada en gránulos dentro del citoplasma. Ante un estímulo apropiado, los gránulos viajan hacia y se funden con zonas especializadas de la membrana plasmática para liberar ó secretar sus contenidos. El proceso de secreción en estas células está altamente regulado (ver sección 2.3 de esta tesis).

Las neuronas GnRHérgicas parecen secretar también a la galanina (Merchenthaler et al., 1990).

+)La hipófisis.

La hipófisis ó pituitaria es una glándula bilobulada que consiste en una amalgama de células endócrinas y de terminales de células nerviosas. En algunos animales se presenta además un lóbulo intermedio entre el lóbulo anterior y el posterior. Estos son anatómica y funcionalmente distintos, y tienen un origen embriológico diferente. La irrigación de la hipófisis se lleva al cabo por un microsistema de circulación porta.

Las células endócrinas se agrupan en el lóbulo anterior, también llamado adenohipófisis. Estas células producen un número importante de hormonas que regulan distintos aspectos endócrinos y fisiológicos. Las células adenohipofisiarias están generalmente reguladas, en cuanto a la síntesis y secreción de sus productos, por distintos factores hipotalámicos neurosecretados al sistema porta. El lóbulo posterior ó neurohipófisis está compuesto por axones de neuronas que los proyectan desde el hipotálamo; estos axones también liberan hormonas a la circulación.

La hipófisis se localiza en una estructura peculiar de la base del cráneo llamada "silla turca", que tiene forma de media esfera. Esta glándula está separada del hipotálamo por una estructura de la duramadre llamada diafragma, excepto en la parte por donde cruza el tallo neural, que comprende a los axones integrantes de la neurohipófisis.

++)Hipófisis anterior.

En la hipófisis anterior se han distinguido, mediante diferentes técnicas como histoquímica, inmunocitoquímica, microscopía electrónica de transmisión, e hibridización *in situ* (ver Page, 1988), distintas poblaciones de células que al parecer sintetizan cada una de manera preferencial un tipo de hormona. Estas células se han identificado como:

- 1-lactotropos, en los que se sintetizaría preferentemente PRL;
- 2-tirotropos, que secretarían principalmente TSH;
- 3-gonadotropos, que liberarían LH y FSH;

4-corticotropos, que contienen un péptido llamado POMC cuya degradación enzimática parcial da origen a ACTH, beta-LPH, y beta-End; y

5-somatotropos, que producirían la GH.

A pesar de lo anterior, no es posible establecer una relación biunívoca entre un tipo de hormona hipotalámica y un tipo de célula blanco en la hipófisis. Esto se debe a que un mismo factor hipotalámico puede modular la actividad de varios tipos celulares hipofisarios, aunque module predominantemente a uno, y un mismo tipo celular hipofisario puede responder a varios factores hipotalámicos, aunque responda principalmente ante uno (ver Page, 1988).

++)Hipófisis posterior.

La neurohipófisis está constituida por fibras (axones) que provienen de cuerpos celulares de neuronas magnocelulares localizadas en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo. Estas fibras terminan en capilares sanguíneos del sistema porta y de la circulación sistémica. La dirección del flujo sanguíneo es tal que la sangre que pasa por la neurohipófisis entra casi inmediatamente a la circulación periférica.

Las neuronas cuyos axones integran a la neurohipófisis sintetizan y secretan oxitocina y vasopresina asociadas a sus respectivas neurofisinas (I y II, respectivamente). Recientemente se ha observado la presencia de la variante de 16K de la PRL en medios en los que fueron incubadas neurohipófisis de rata (Clapp et al., 1994).

++)Gonadotropos: producción de LH y FSH.

Los gonadotropos, cuya principal función es la secreción de LH y FSH, son de tamaño variable y constituyen aproximadamente un 14% de la población celular total de la adenohipófisis de la rata adulta, tanto en machos como en hembras (ver Tougard y Tixier-Vidal, 1988). De estas células, aproximadamente un 80% contiene LH y FSH; 10% contienen sólo LH, y el restante 10% contienen sólo FSH.

La LH y la FSH, de naturaleza glicoproteínica, han sido secuenciadas y ambas tienen un peso molecular aproximado de 28-29 kDa. Cada una de ellas está compuesta por dos subunidades distintas entre sí, llamadas alfa y beta, mismas que están unidas por enlaces no covalentes. Las subunidades son ricas en puentes disulfuro intramoleculares (cinco en la subunidad alfa y seis en la subunidad beta), y están glicosiladas en residuos específicos de serina y asparagina por distintos carbohidratos como N-acetil galactosamina, N-acetil glucosamina, etc. (ver Pierce, 1988). Es muy probable que los carbohidratos jueguen un papel determinante en el reconocimiento de la hormona por el receptor. Esto lo sugieren distintos experimentos en los que la modificación del número, posición, y tipo de oligosacáridos se pueden correlacionar con cambios en la bioactividad de las proteínas (ver Pierce, 1988).

La secreción de estas hormonas, estimulada por GnRH, es pulsátil: en ovejas ovariectomizadas, es posible establecer una correlación directa entre los pulsos de GnRH y los de LH. Estos pulsos son sincrónicos (Clark y Cummins, 1982). Sin embargo, la GnRH aparentemente no es tan potente para estimular la secreción de FSH como lo es para la de LH.

La GnRH tiene un efecto directo sobre la síntesis de mRNA de las subunidades beta de LH y FSH, y del mRNA de la subunidad alfa común a ambas; el incremento en la tasa de síntesis de estos mensajeros parece depender de la amplitud de los pulsos de GnRH (Haisenleder et al., 1993).

Los gonadotropos presentan en sus membranas receptores de GnRH; el receptor parece ser una glicoproteína con un peso molecular aproximado de 60 kDa (Hazum, 1982).

La secreción de LH estimulada por GnRH depende, al menos parcialmente, de los niveles de Ca^{2+} intracelulares (ver Hawes y Conn, 1990). Esto sugiere que el efecto de GnRH está mediado por una activación directa de los canales de Ca^{2+} . Además, es muy probable la participación directa de agentes movilizadores de Ca^{2+} intracelular, principalmente en la fase temprana de la respuesta.

En los gonadotropos, la activación del receptor de GnRH está también acoplada a la hidrólisis de fosfoinosítidos. La producción de $Ins1,4,5P_3$ en estas células es dependiente de la dosis de GnRH y puede ser bloqueada con antagonistas GnRHérgicos (Hawes y Conn, 1990).

+Gónadas: Regulación de funciones reproductivas y esteroidogénesis.

Las gónadas son órganos en los que se realizan funciones distintas pero relacionadas: la gametogénesis, y la producción de hormonas esteroides ó esteroidogénesis.

Las hormonas esteroides sexuales se sintetizan a partir del colesterol mediante vías que son comunes en ambas gónadas; estas vías son esencialmente idénticas a aquellas existentes en la corteza suprarrenal. En las gónadas se producen andrógenos, estrógenos y progestágenos. Las principales hormonas androgénicas son la testosterona, la dihidrotestosterona, y el androstanediol, mientras que los principales estrógenos son el estradiol y la estrona. El principal progestágeno es la progesterona. Estas hormonas tienen efectos sobre las gónadas, principalmente en la regulación y facilitación de la gametogénesis. Además, tienen una gran variedad de efectos extragonadales, como lo son la aparición y mantenimiento de caracteres sexuales secundarios, y la modulación de algunos aspectos del SNC, entre ellos la conducta y la libido. Estas hormonas están también involucradas, entre otras cosas, en la estimulación de la hematopoesis, y en la coordinación de cambios en el útero, vagina y glándulas mamarias como preparación para la fertilización e implantación.

La gametogénesis es un proceso complejo por medio del cual las células de las líneas germinales se transforman en óvulos ó espermatozoides. En este proceso las células sufren, entre otras cosas, una serie de alteraciones morfológicas profundas, así como una reducción en el número de sus cromosomas por medio de la meiosis.

La LH y la FSH actúan sobre sobre las gónadas, donde modulan distintas funciones. En el testículo, la FSH actúa sobre las células de Sertoli, y estimula la espermatogénesis. La LH actúa principalmente sobre las células de Leydig, donde estimula la producción de testosterona y de estradiol por conversión de testosterona a este último.

En el ovario, la FSH estimula a las células de la granulosa, e induce el desarrollo de los folículos y la síntesis de estradiol. La FSH además aumenta la responsividad a la LH en las células de la granulosa sobre las que la LH actúa. La LH, además de estimular a éstas últimas, también estimula a células de la teca y a células lúteas, donde promueve la síntesis de estradiol, progesterona y testosterona.

La LH también promueve la ovulación mediante una serie de eventos muy complejos que, entre otras cosas, están relacionados con la degradación de la estructura del folículo de Graaf por medio de la activación de proteasas séricas.

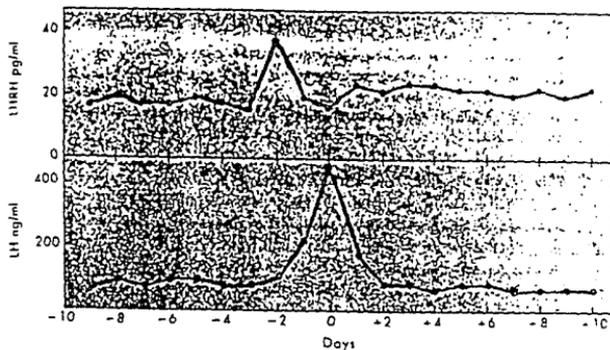
Los perfiles de los niveles de todas estas hormonas durante el ciclo menstrual ó estral en las hembras son muy distintos a los que presentan los machos. Debido a que en el macho la producción de espermatozoides y la disposición para la reproducción es prácticamente constante, no parece haber oscilaciones cíclicas infradianas en los niveles de las hormonas mencionadas. Lo contrario es lo que se observa en las hembras (fig. 2). Por esta razón, en la siguiente sección se discutirá con mayor detalle el ciclo ovárico y su control neuroendócrino.

-Integración: el ciclo ovárico.

En el humano, el ciclo ovárico se divide en tres fases: la fase folicular, la ovulatoria, y la lútea. En la rata, que tiene un ciclo estral, se divide en cuatro: proestro, estro, metaestro y diestro.

En el humano, la fase folicular principia con el comienzo del sangrado, producto del desprendimiento del endometrio uterino. La duración de esta fase es variable. La fase ovulatoria dura de uno a tres días, y culmina con la ovulación. La fase lútea tiene una duración más ó menos constante de 13 a 14 días y termina con el principio de la menstruación. La duración total del ciclo es de 21 a 35 días, con un promedio de 28; ésta depende principalmente de la duración de la fase folicular.

Durante el ciclo se observan oscilaciones en los niveles de esteroides sexuales circulantes. Éstas son en parte la consecuencia de fluctuaciones en los niveles de las gonadotropinas, que a su vez son regulados por niveles oscilantes de GnRH. Las oscilaciones en los niveles de esteroides sexuales también son provocadas por los mismos esteroides. Esto se lleva a cabo por medio de retroalimentaciones positivas y negativas que ejercen dichas hormonas sobre el hipotálamo y la hipófisis (Clark y Cummins, 1982).



B

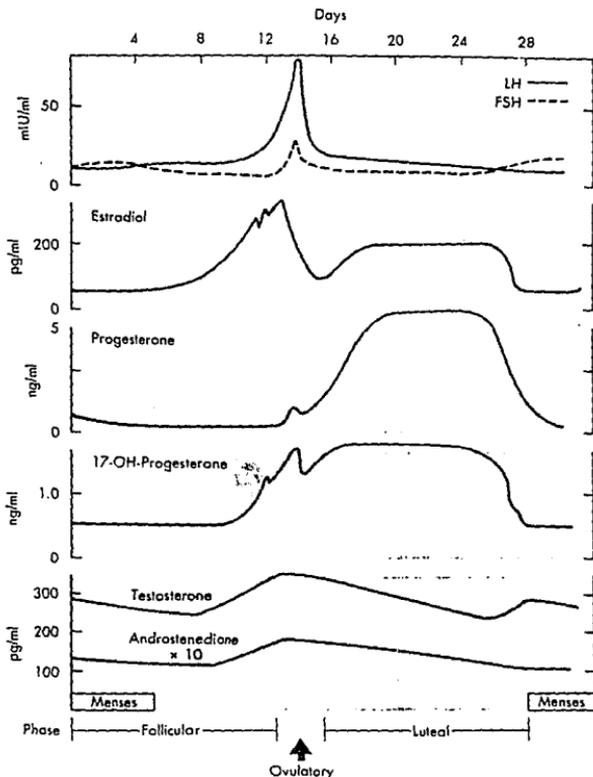


Fig.2. Variación diaria en los niveles de GnRH (LHRH) y LH en plasma en mujeres normales (A). (B) Perfiles de LH, FSH, estradiol, progesterona, 17-OH-progesterona, testosterona y androstenediona en plasma durante el ciclo menstrual en la mujer. (A, tomado de Sarda, A.K. et al. 1981. *J. Clin. Endocrinol.* 15, 265. B, tomado de Yen, S.S.C. y Jaffe, R.B. 1978. "Reproductive endocrinology"; W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA U.S.A.).

Al comienzo del ciclo, los niveles de LH y FSH están en su nivel más bajo, al igual que los niveles de estradiol, estrona, progesterona y 17-OH-progesterona. En este momento, la relación (cociente) entre la concentración de LH y la de FSH es un poco mayor que 1. Durante la primera mitad de la fase folicular, los niveles de FSH comienzan a elevarse, seguidos por los de LH. Los niveles de estradiol y estrona comienzan a incrementarse ligeramente, mientras que los de progesterona y 17-OH-progesterona permanecen bajos y sin cambios durante estos 6 a 8 días; lo mismo sucede con la androstanediona y la testosterona.

Durante la segunda mitad de la fase folicular, los niveles de FSH disminuyen ligeramente, mientras que los de LH continúan aumentando lentamente. De esta manera, la relación LH/FSH aumenta a aprox. 2. Los niveles de LH siguen cercanamente a los de GnRH, que tienen un comportamiento oscilatorio y pulsátil. En la rata, los picos de LH se correlacionan directamente con picos de GnRH (Levine y Duffy, 1988).

Concurrentemente, los niveles en plasma de estradiol, que es secretado directamente por los ovarios, y de estrona, que es producida por conversión periférica de estradiol y androstanediona, aumentan marcadamente y alcanzan un nivel pico 5 a 9 veces mayor que el nivel previo. Esto sucede justo antes de la ovulación, como consecuencia de la previa estimulación del ovario por LH y FSH. Los niveles de progesterona y de 17-OH-progesterona durante esta segunda mitad se mantienen bajos hasta justo antes de la fase ovulatoria, cuando la progesterona empieza a ser secretada por los ovarios. Los niveles de testosterona y androstanediona siguen un perfil parecido al de la 17-OH-progesterona.

La fase ovulatoria, que dura de uno a tres días, se caracteriza por un aumento abrupto y transitorio en los niveles de las gonadotropinas (LH surge ó pico de LH); el aumento de LH es relativamente mayor que el de FSH. De esta manera, la relación LH/FSH llega a alrededor de 5. Este aumento abrupto en los niveles de LH es normalmente precedido por un aumento con las mismas características (abrupto y transitorio) en los niveles de GnRH. Los niveles elevados de gonadotropinas persisten por alrededor de un día, y después comienzan a disminuir.

Los niveles de estradiol disminuyen marcadamente durante esta fase, al mismo tiempo que tiene lugar el incremento en los niveles de las gonadotropinas. Los niveles en sangre de estrona, 17-OH-progesterona, testosterona y androstanediona comienzan a disminuir, pero a un ritmo más lento que el del estradiol. Por otro lado, es posible observar un pequeño aumento en la progesterona.

Durante la fase lútea, los niveles de LH y FSH siguen disminuyendo hasta alcanzar su valor más bajo al final de la fase, justo antes del comienzo de la menstruación. En esta fase, se observa un incremento de 10 veces en los niveles de progesterona, que es sintetizada activamente en el cuerpo lúteo. Hacia el final de la fase, los niveles de esta hormona comienzan a disminuir hasta alcanzar su nivel más bajo.

También se observa un segundo pico en los niveles de estradiol, estrona y 17-OH-progesterona, que termina al final de la fase. Los niveles de androstenediona y testosterona disminuyen durante la fase lútea hasta alcanzar su nivel más bajo justo antes de la menstruación.

Los estrógenos parecen tener diferentes efectos sobre la regulación de la secreción de GnRH y de gonadotropinas. Esto parece depender de la fase del ciclo ovárico en la que se encuentre el animal. Apparently, el pequeño aumento en los niveles de estrógenos en la fase folicular, al principio del ciclo, estimula la secreción de GnRH y aumenta la responsividad de los gonadotropos a la GnRH. En estas células, los estrógenos también participan, al parecer directamente, en el control de la síntesis y secreción de gonadotropinas; éstas últimas estimulan a su vez la producción de estrógenos.

Los estrógenos, cuyos niveles aumentan de manera importante durante la segunda mitad de la fase folicular, parecen inhibir la secreción de GnRH y de gonadotropinas (opuestamente a lo descrito anteriormente) después de dicha fase fase.

Así, al principio de la fase, cuando sus niveles son bajos y comienzan a subir lentamente, los estrógenos tienen un efecto positivo sobre el control de la secreción de gonadotropinas. Después de la segunda mitad de la fase, cuando los niveles se han incrementado de 5 a 9 veces, los estrógenos tienen un efecto negativo.

A pesar de la existencia de distintas hipótesis, hasta el momento no se ha logrado establecer claramente el mecanismo por el cual estos esteroides ejercen, al parecer paradójicamente, ambos tipos de control.

Además de los estrógenos, existen otros factores que están involucrados en la regulación del ciclo ovárico, como lo son las señales medioambientales, el estado interno del organismo, el control neuronal sobre las neuronas GnRHérgicas, y la actividad intrínseca de éstas. Las entidades y/o mecanismos que regulan la ritmicidad del fenómeno no se han identificado con absoluta precisión; sin embargo, se postula

la existencia de un oscilador ovárico, de un oscilador neural, ó de una combinación de éstos.

Los ciclos estrales son muy parecidos, en sus eventos y componentes, a los menstruales, con la diferencia de que la periodicidad es más corta (duran 4 ó 5 días). En los ciclos estrales, como en los menstruales, también es posible observar fluctuaciones periódicas en los niveles de esteroides gonadales y de gonadotropinas. En estos ciclos también existe la secreción abrupta y transitoria de LH (pico de LH), además de estar presentes las oscilaciones en los niveles de GnRH.

Es posible que muchos de los mecanismos de regulación de los ciclos estrales y menstruales sean idénticos.

2.2-Transducción de señales celulares: AMP cíclico e hidrólisis de fosfoinosítidos.

-Consideraciones generales sobre la transducción de señales y los segundos mensajeros: el caso del AMP cíclico.

En la década de los 50's, Rall y Sutherland, al tratar de esclarecer el mecanismo mediante el cual la E causa la liberación de glucosa por células hepáticas, encontraron que la adición de ese compuesto a fragmentos de hepatocitos provoca la formación de un compuesto, hasta entonces desconocido, identificado como cAMP. Estos y otros estudios llevaron a la identificación de una enzima, la adenilato ciclasa, que cataliza la ciclización del AMP (ver Linder y Gilman, 1992) en respuesta a la E.

Al principio se postuló que el receptor de E y la adenilato ciclasa eran una sola entidad; sin embargo, esto resultó no ser cierto. Lo anterior motivó la búsqueda de algún elemento que comunicara a estas dos moléculas, y llevó a la identificación de las proteínas que se unen al GTP, ó proteínas G, como intermediadoras entre la activación del receptor y la estimulación de la adenilato ciclasa. La elevación en los niveles de cAMP provoca, por medio de una cascada enzimática que involucra la fosforilación de un número de substratos, una mayor degradación de glucógeno. De esta manera es como una señal extracelular, mediante el proceso de transducción, que consiste en la conversión de una señal extracelular en una intracelular, ejerce sus efectos metabólicos.

Ahora se sabe que el cAMP está involucrado, principalmente de manera regulatoria, en un número importante de aspectos del funcionamiento celular, tales como secreción, contracción, metabolismo, etc.

La transducción consta de una serie de eventos, en cada uno de los cuales se puede amplificar la señal. Éstos son, brevemente:

- la estimulación del receptor por su ligando;
- la activación de la proteína G participante, mediante su interacción con el receptor estimulado;
- la activación, por la proteína G, de los "efectores" ó enzimas que generan señales intracelulares; y

-la modificación de distintos aspectos de la fisiología de la célula, como efecto de la acción de las señales intracelulares así generadas.

Estas últimas son llamadas generalmente "segundos mensajeros". Un solo ligando puede estimular a varios receptores; un receptor puede activar a varias proteínas G; una proteína G activada puede estimular a varios efectores; y un solo segundo mensajero puede actuar sobre más de uno de sus substratos de acción (ver, por ejemplo, fig. 3).

Ahora se sabe que un número importante de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, que son impermeables a la membrana plasmática, ejercen sus acciones intracelulares por medio de su unión a receptores específicos en la superficie de la célula y la consiguiente activación de la producción de segundos mensajeros. Entre éstos destacan el cAMP, el cGMP, el Ca^{2+} , y la vía de la hidrólisis de fosfoinosítidos, entre otros. Otros receptores, algunos de ellos de factores de crecimiento, y aparentemente el de insulina, tienen una actividad intrínseca de tirosina cinasa. Estos receptores, cuando se unen a su ligando, son capaces de fosforilar substratos intracelulares; de esta manera, llevan a cabo la transducción de la señal (Pazin y Williams, 1992).

La vía de la hidrólisis de fosfoinosítidos se discutirá con mayor detalle en las secciones siguientes.

-Hidrólisis de fosfoinosítidos.

+)Panorama general.

La hidrólisis de fosfoinosítidos es un mecanismo de transducción de señales celulares en el que participan dos segundos mensajeros distintos: el $Ins1,4,5P_3$ y el DAG. Éstos se generan a partir de los fosfoinosítidos, que son fosfolípidos integrantes de la membrana plasmática, por medio de la acción de la PLC. Esta enzima hidroliza a los fosfoinosítidos precursores en respuesta a la activación de ciertos receptores por sus ligandos. En la mayoría de los casos, la activación de la PLC está mediada por proteínas G acopladas a dichos receptores (ver Berridge, 1987; Downes, 1988; Berridge e Irvine, 1989) (fig.3).

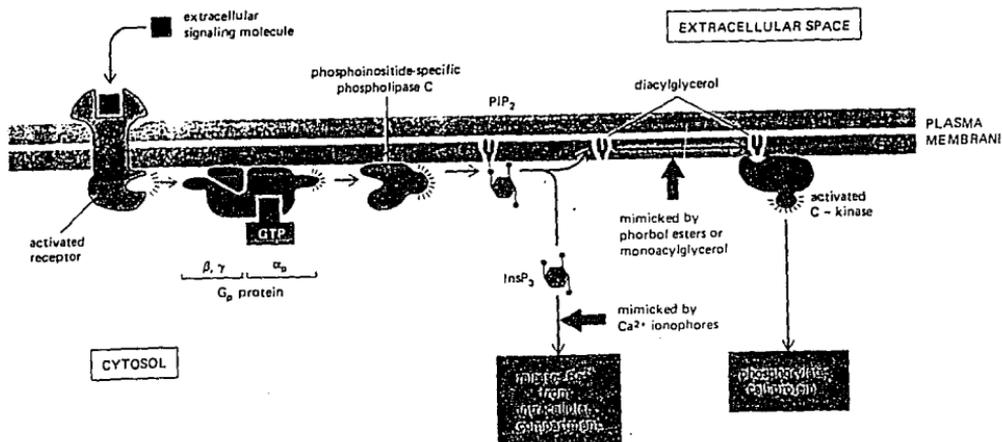


Fig.3. Representación esquemática del mecanismo de transducción empleado por la vía de la hidrólisis de fosfoinosítidos. La unión de ciertos ligandos (como hormonas, neurotransmisores, etc.) con sus receptores provoca, mediante un cambio conformacional, la activación de éstos. La interacción de proteínas G específicas con los receptores activados tiene la consecuencia de que en la subunidad alfa de la proteína G se intercambie GDP por GTP. Esto provoca que la subunidad alfa se disocie de las subunidades beta-gamma. La subunidad alfa unida a GTP es entonces capaz de estimular a la fosfolipasa C. Esta última, al estar activada, hidroliza a los fosfoinosítidos de la membrana con la consecuente liberación de inositol 1,4,5 trisfosfato (Ins1,4,5P3) y de diacilglicerol (DAG).

El Ins1,4,5P3 provoca un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} al estimular la salida de Ca^{2+} de pozos intracelulares tales como el retículo endoplásmico. El Ca^{2+} , a su vez, funciona como un segundo mensajero. Por su lado, el DAG activa a la cinasa C de proteínas (PKC), la cual es entonces capaz de fosforilar a diversas proteínas celulares. (Tomado de Alberts, B. et al. 1989. "Molecular Biology of the Cell" 2ª ed. Garland Publishing Inc. New York, USA)

El Ins1,4,5P_3 y el DAG tienen distintos efectos intracelulares. El Ins1,4,5P_3 libera Ca^{2+} de pozas intracelulares, como el retículo endoplásmico. El Ca^{2+} , a su vez, funciona como un importante segundo mensajero al modular la actividad de distintos elementos celulares. Por otro lado, el DAG activa a la PKC. Esta enzima, al fosforilar a un número importante de sustratos, regula algunas funciones de la célula. Es posible que estos dos segundos mensajeros interactúen en cuanto a sus efectos (ver Berridge, 1987).

+)Estructura y metabolismo de los fosfoinosítidos.

Los fosfoinosítidos constituyen de un 2 a un 8% de los fosfolípidos que integran a la membrana plasmática (ver Majerus et al., 1986). El grupo polar de los fosfoinosítidos está conformado por una molécula de mioinositol, el cual es un polialcohol cíclico compuesto por 6 átomos de C. La unión de esta molécula al ácido fosfatídico, mediante un enlace fosfodiéster en la posición 1 del inositol, genera fosfatidilinositol. Este último se puede fosforilar hacia fosfatidilinositol 4 fosfato, mismo que puede ser subsecuentemente fosforilado hacia fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato. En muchas células es posible encontrar formas aún más fosforiladas que este último (ver Majerus et al., 1986). Los polifosfoinosítidos representan aprox. de un 10 a un 20% de los fosfoinosítidos presentes en la membrana (idem.).

+)Generación de IP_x y DAG.

Numerosos estudios indican que en diversas células los fosfoinosítidos pueden ser hidrolizados por la PLC en respuesta a una variedad de estímulos tales como hormonas, luz, neurotransmisores, y factores de crecimiento, entre otros (ver por ejemplo Berridge, 1987; Downes, 1988; Berridge e Irvine, 1989; Rhee y Choi, 1992). Los productos de esta hidrólisis son principalmente Ins1,4,5P_3 y DAG. La hidrólisis de fosfoinosítidos por la PLC parece estar acoplada, por medio de proteínas G, a la activación de algunos tipos de receptores (ver Berridge, 1987), aunque hay otros receptores que activan directamente a la PLC (ver Rhee y Choi, 1992), como se verá más adelante.

El metabolismo de los IP_x es sumamente complejo (ver Putney et al., 1989). Solamente del IP_3 existen 20 posibles isómeros; además, los fosfoinosítidos pueden tener enlaces

cíclicos de fosfato, por ejemplo, inositol 1:2 cíclico 5 bisfosfato. De los más de 63 IPx que pueden existir, más de 20 se han identificado en distintos tejidos (ver Fisher et al., 1992).

El Ins1,4,5P3, que es el único de los IPx al que hasta ahora se le ha asignado un inequívoco papel como segundo mensajero, puede ser inactivado mediante la remoción de un fosfato en la posición 5 por una polifosfoinositol 5 fosfatasa, ó por la adición de un fosfato en la posición 3, por una polifosfoinositol 3 cinasa. Los productos resultantes pueden ser subsecuentemente fosforilados y/o desfosforilados, lo que genera un número enorme de intermediarios del polifosfoinositol cuyos casos extremos son el inositol hexaquisfosfato (ácido fítico), y el mioinositol. Este último se puede unir al ácido fosfatídico para regenerar las pozas de fosfoinosítidos (ver Berridge, 1987; Berridge e Irvine, 1989; Downes, 1988; Fisher et al., 1992; y Putney et al., 1989).

El mioinositol se genera a partir de la desfosforilación de distintos isómeros del IP1 por la inositol monofosfatasa, y también se puede sintetizar de novo a partir de la glucosa 6-fosfato (ver Parthasarathy y Eisenberg, 1986).

La inositol monofosfatasa es susceptible de ser inhibida no competitivamente por Li^+ (ver Nahorski et al., 1988; Nahorski, 1991; Berridge, 1987; y Parthasarathy y Eisenberg, 1986). El bloqueo por Li^+ provoca una acumulación de los productos de degradación del Ins1,4,5P3. La medición de estos productos es una medida indirecta de la producción de Ins1,4,5P3 en respuesta a algún estímulo. En el presente trabajo se empleó Li^+ por estas razones.

Por otro lado, se ha postulado que algunos isómeros del Ins1,4,5P3, tal como el Ins1,3,4P3, así como algunos intermediarios del metabolismo del Ins1,4,5P3, particularmente el Ins1,3,4,5P4, tienen también funciones biológicas como segundos mensajeros, ó como mensajeros extracelulares (ver Irvine, 1992; Downes, 1988; Nahorski, 1988; y Fink y Kaczmarek, 1988).

La vía de la hidrólisis de fosfoinosítidos está relacionada con un número importante de aspectos de la fisiología celular, tales como metabolismo, secreción, contracción, proliferación celular, cambios en la dinámica citoesquelética, y actividad neuronal (ver Berridge e Irvine, 1989; Moolenaar, 1991; Forscher, 1989), entre otros.

+)PLC, proteínas que se unen a GTP, y receptores acoplados a la PLC.

++) PLC

La PLC hidroliza el enlace entre el fosfato que une al fosfoinositol con el diacilglicerol, y el tercer C de este último. Recientemente se han clonado y secuenciado 16 PLCs distintas; éstas pueden ser agrupadas en tres tipos: PLC beta, PLC gamma, y PLC delta (ver Rhee y Choi, 1992). Los tres tipos de PLCs comparten dos regiones de homología, denominadas X y Y. Las PLC gamma tienen además dominios que tienen homología con el proto-oncogén *src*; esto es, dominios SH2 y SH3 que fueron identificados originalmente como regiones no catalíticas comunes a un número de tirosinas cinasas de la familia *src* (ver Rhee y Choi, 1992; Irvine, 1992; y Fisher et al., 1992).

Las PLC beta parecen ser activadas por proteínas G. In vitro, la subunidad alfa de una proteína G, G alfa q, pudo estimular la hidrólisis de fosfoinosítidos por medio de la PLC beta 1, mas no por medio de la PLC gamma 1 ni de la PLC delta 1 (ver Rhee y Choi, 1992; e Irvine, 1992). La activación de las PLC gamma parece ser independiente de las proteínas G, y estar dada por fosforilación en ciertos residuos de tirosina de la enzima por algunos receptores que tienen actividad intrínseca de tirosina cinasa. Muchos de estos receptores se unen a factores de crecimiento tales como PDGF, NGF, y FGF, entre otros. Los mecanismos de acción de las PLC delta son desconocidos (ver Rhee y Choi, 1992; Irvine 1992; y Widmer et al., 1993).

+ +) Proteínas que se unen a GTP.

Algunas proteínas que se unen a GTP, también llamadas proteínas G, acoplan a varios tipos de receptores con la PLC y la producción de IPx. Las proteínas G son heterotrómeros de aprox. 90 kDa compuestos por tres subunidades distintas: alfa, beta, y gamma. Estas proteínas tienen actividad de GTPasa (i.e., capacidad de unirse, e hidrolizar, al GTP); el dominio catalítico está en la subunidad alfa. Las proteínas G difunden sobre el plano citoplásmico de la membrana plasmática.

La subunidad alfa generalmente está unida a GDP. Cuando la proteína G entra en contacto con un receptor activado al cual ella es capaz de reconocer, en la subunidad alfa se intercambia el GDP por GTP. Esto tiene al parecer la consecuencia de que la subunidad alfa se disocie de las subunidades beta y gamma, que permanecen

constantemente unidas. La subunidad alfa, unida a GTP, sufre aparentemente un cambio conformacional tal que su interacción con algún efector (en este caso la PLC beta) tiene el efecto de activar a este último.

La rapidez con la que la subunidad alfa lleva a cabo la hidrólisis de GTP determina en parte la duración de la respuesta, ya que al estar activada puede activar a más de un efector. Cuando la subunidad alfa hidroliza al GTP, vuelve a sufrir un cambio conformacional que la hace de nuevo más afín por el complejo beta-gamma, y de esta manera se inactiva. Así, la subunidad alfa funciona como un "interruptor" y como un "timer" de las señales extracelulares (ver Hepler y Gilman, 1992; Linder y Gilman, 1992). Además, un solo tipo de subunidad alfa puede regular la actividad de más de un efector (ver Hepler y Gilman, 1992).

Al parecer, es la subunidad alfa de estas proteínas la que lleva a cabo la transducción de la señal, aunque se ha postulado que el complejo beta-gamma también tiene funciones importantes. Hasta la fecha, se han identificado 21 genes que codifican a subunidades alfa diferentes. Éstas se pueden dividir en 4 grandes subfamilias: Go, Gi, G12 y Gq. Las subunidades G alfa q son las que aparentemente interactúan con la PLC beta (ver Deckmin et al., 1993; Hepler y Gilman, 1992). Además, se han identificado 4 formas distintas de la subunidad beta y 6 de la gamma (ibíds.; ver Irvine, 1992).

Por lo menos algunas de las proteínas G parecen ser sensibles a ciertas toxinas bacterianas. Por ejemplo, la toxina del cólera impide la hidrólisis del GTP por la subunidad alfa, y mantiene a ésta constantemente activada, mientras que la toxina pertussis bloquea la interacción entre la proteína G y el receptor activado. Estas toxinas son utilizadas ampliamente para determinar si algún proceso de transducción involucra a alguna proteína G. Además, las proteínas G varían en su sensibilidad a las toxinas (ver Linder y Gilman, 1992).

Algunas de las proteínas G tienen una función inhibitoria: su activación inhibe al efector. Se ha planteado la existencia de proteínas G inhibitorias de la PLC (ver Berridge, 1987; Fisher, 1992; Hepler y Gilman, 1992). Por otro lado, algunas proteínas G tienen como efectores a canales iónicos en el SNC; de esta manera, la unión de un neurotransmisor a su receptor provoca un cambio en la conductancia postsináptica sin que ese receptor sea a la vez un canal iónico (ver Hepler y Gilman, 1992).

La transmisión de la señal por las proteínas G constituye una instancia más de regulación y de modulación en la transducción y en la comunicación celular. De hecho, experimentos hechos por Ashkenazi et al. (1989) sugieren que distintas proteínas G pueden acoplar a distintos receptores con la hidrólisis de fosfoinosítidos en una misma célula; estos receptores pueden inclusive interactuar con el mismo ligando. En ese estudio, se analizaron las respuestas a la estimulación de los receptores muscarínicos colinérgicos M1, M2 y M4 (entre otros). Estos tres receptores, que reconocen al mismo ligando, están acoplados a la PLC aparentemente por medio de distintas proteínas G, en la misma célula (ibid.).

++) Receptores acoplados a la PLC.

Muchos de los receptores que están acoplados a la hidrólisis de fosfoinosítidos, pertenecen a la gran familia de proteínas de membrana que presentan siete dominios transmembranales y que están acoplados a la activación de proteínas G. Otros, como ya se mencionó, fosforilan directamente a la PLC gamma. Entre estos últimos se encuentran receptores de diversos factores de crecimiento.

Entre los receptores acoplados a la hidrólisis de fosfoinosítidos por medio de proteínas G se encuentran receptores de diversos neurotransmisores, tales como los de acetilcolina (muscarínicos), adrenérgicos (alfa-1A y alfa-1B), serotoninérgicos (5-HT-2 y 5-HT-1C), glutamatérgicos (metabotrópicos), e histaminérgicos (H1). También acoplados a la PLC por proteínas G, se encuentran los receptores de distintos péptidos, tales como la endotelina, bradisinina, vasopresina, TRH, oxitocina, angiotensina, y VIP, entre otros (ver Fisher et al. 1992; Rhee y Choi, 1992; Nahorski, 1988).

+) Acciones del Ins1,4,5P3 y del DAG.

Una vez separado del DAG por la PLC, el Ins1,4,5P3 puede difundirse en el citoplasma. Allí, se une a receptores específicos, llamados IP3R's, localizados aparentemente en el retículo endoplásmico (Ross et al., 1989). Los IP3R's parecen funcionar también como canales de Ca^{2+} . La unión del Ins1,4,5P3 a estos receptores provoca una salida de Ca^{2+} de esa poza intracelular, y una consecuente elevación en la $[Ca^{2+}]_i$. El Ca^{2+} tiene un número de funciones importantes en la regulación de varios procesos celulares, tales como contracción, secreción y metabolismo. De este modo, el Ins1,4,5P3 traduce ulteriormente la señal extracelular a cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. Por otro lado, el DAG

activa a la PKC, que al fosforilar a un número importante de componentes celulares, modifica también el funcionamiento de la célula (ver Berridge, 1987).

El IP3R es aparentemente una proteína homotetramérica compuesta por subunidades de 313 kDa de peso molecular cada una. Esta proteína tiene dominios de unión al $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ en la región N-terminal de cada subunidad. El canal de Ca^{2+} está constituido por regiones transmembranales localizadas en la región C-terminal. Entre estas dos regiones existe un dominio llamado "dominio de enlace", en el que están presentes dos sitios de fosforilación (Irvine, 1992; Schell et al., 1993). Parecen existir diferentes genes que codifican a distintos IP3R's; además, los transcritos de estos genes parecen tener distintos sitios de edición ó *splicing*. Las formas generadas por edición alternativa muestran diferentes patrones de fosforilación (Schell et al., 1993; Irvine, 1992), por lo que distintas cinasas podrían regular la actividad de las distintas isoformas del IP3R. Aparentemente, las diferentes formas se expresan de manera tejido-específica (Schell et al., 1993). Lo anterior parecería adaptar el funcionamiento del IP3R a las condiciones de un tipo celular dado.

+) Acciones del Ca^{2+} y de la PKC.

++) Ca^{2+} .

Un número importante de aspectos de la fisiología celular están regulados por el Ca^{2+} . Algunas de las acciones intracelulares de este catión están mediadas por su unión a la calmodulina, una proteína que al unirse al Ca^{2+} es capaz de activar a distintas cinasas de proteínas. Un parámetro importante que determina las acciones de este catión es su concentración intracelular, la cual varía de manera compleja tanto en el espacio como en el tiempo, en respuesta a un número de estímulos. Muchas enzimas y proteínas, tales como la PKC, son moduladas por, pero no absolutamente dependientes de, Ca^{2+} en su actividad. En este caso, el Ca^{2+} actúa como una especie de cofactor.

El Ca^{2+} también parece regular procesos que movilizan al propio Ca^{2+} de pozas intracelulares, así como procesos que controlan la entrada de Ca^{2+} extracelular. Entre estos últimos están, por ejemplo, la activación de canales de Ca^{2+} activados por voltaje, y de canales de Ca^{2+} operados por ligando (ver Forscher, 1989).

Un hecho bien conocido es el que generalmente un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ provoca secreción por células secretoras. Esta secreción se lleva a cabo al parecer por medio de exocitosis. A este respecto, los canales de Ca^{2+} operados por voltaje localizados en las membranas de las terminales nerviosas neurosecretoras juegan un papel crucial en la secreción exocitótica de neuropéptidos y/o neurotransmisores (ver Wang et al., 1993). Sin embargo, los mecanismos precisos por medio de los cuales el Ca^{2+} ejerce su acción sobre la exocitosis son, hasta donde se sabe, desconocidos.

El Ca^{2+} también parece estar involucrado en la regulación de la estructura celular al modular la actividad de un número importante de proteínas que regulan la dinámica del citoesqueleto, tales como la profilina y la gelsolina. Estas proteínas regulan y modulan la polimerización de la actina, la organización macromolecular de redes de polímeros de actina, y la interacción entre filamentos de actina y la matriz extracelular a través de la membrana plasmática (Forscher, 1989). Estas modulaciones subyacen muchos procesos celulares tales como el crecimiento axonal, y quizás estén involucradas en la proliferación celular asociada a la hidrólisis de fosfoinosítidos provocada por factores de crecimiento (ver Moolenaar, 1991).

Se ha planteado que las proteínas reguladoras del citoesqueleto participan directamente en la secreción mediada por Ca^{2+} . Algunas de estas proteínas reguladoras, como la sinapsina y la fodrina, enlazan a los filamentos de actina e interactúan con la membrana. Las redes de actina organizadas por esas proteínas podrían restringir la difusión de las vesículas sinápticas y quizás detenerlas. El Ca^{2+} , al actuar sobre las proteínas reguladoras, podría tener el efecto de "disolver" la malla de actina, y facilitar el acceso de las vesículas a la membrana plasmática (ver Forscher, 1989; Fisher et al., 1992).

Por otro lado, se ha postulado que los fosfoinosítidos, especialmente aquellos que están glicosilados, sirven como sitios de anclaje para proteínas periféricas tanto extracelulares como intracelulares (ver Berridge, 1987; Fisher et al., 1992). Algunas de estas proteínas probablemente anclan el citoesqueleto a la membrana. En este modelo, la hidrólisis de fosfoinosítidos podría tener también la consecuencia de provocar directamente (¿además de la mediación por Ca^{2+} ?) un rearrreglo en el citoesqueleto y en la estructura celular, al hidrolizar la PLC el sitio de anclaje.

En muchos sistemas, la movilización de Ca^{2+} activada por receptores comprende una fase inicial rápida (normalmente segundos) de liberación de Ca^{2+} de pozas

intracelulares, aparentemente mediada por el $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$. Esta fase es seguida por otra más prolongada de entrada de Ca^{2+} a la célula a través de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (ver Putney et al., 1989; Taylor y Marshall, 1992; Berridge, 1987; y Hanley et al., 1988). Aparentemente, el Ca^{2+} liberado del retículo endoplásmico interactúa con los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, con la consecuencia de la apertura de éstos; sin embargo, se desconocen los detalles (Hanley et al., 1988).

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que normalmente es de 50-100 nM, varía de manera compleja en respuesta a estímulos como el $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ ó a la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (e.g. por despolarización). Frecuentemente se han observado oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} en forma de picos repetitivos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y de ondas u olas de Ca^{2+} que se propagan a través de la célula y a veces hacia células vecinas (ver Taylor y Marshall, 1992; Amundson y Clapham, 1993; Berridge e Irvine, 1989). El significado funcional de este tipo de señalización es desconocido, aunque dada la cantidad de parámetros que pueden variar y controlarse en una respuesta tan compleja (entre ellos parámetros espacio-temporales), es posible imaginar que estas oscilaciones codifican mucha información, y que seguramente la sensibilidad en la graduación de la respuesta es muy fina.

++) PKC.

La PKC es una proteína periférica de membrana, con un peso molecular de aprox. 80 kDa (Bell, 1986). Al menos 7 subtipos distintos de esta enzima han sido identificados (Nishizuka, 1988).

El DAG aumenta la afinidad de la PKC por el Ca^{2+} ; la unión de la enzima con el DAG le confiere a ésta la capacidad de activarse en presencia de niveles intracelulares de Ca^{2+} . Aparentemente, el Ca^{2+} controla la asociación de la PKC con la membrana, mientras que el DAG controla la activación de la enzima y también la asociación de ésta a la membrana (ver Nishizuka, 1988).

La PKC también puede ser activada por DAG proveniente de la hidrólisis de otros fosfolípidos (como fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina). Estos fosfolípidos son hidrolizados por fosfolipasas distintas a la PLC, como por ejemplo la fosfolipasa D. Por lo tanto, las otras fosfolipasas también contribuyen a la estimulación de la PKC (ver Asaoka et al., 1992).

La PKC puede ser estimulada experimentalmente con ésteres de forbol, que son agentes promotores de tumores.

-Hidrólisis de fosfoinosítidos en el sistema nervioso.

El sistema nervioso no es ninguna excepción en cuanto a la hidrólisis de fosfoinosítidos; de hecho, más de 25 receptores farmacológicamente distintos acoplados a esta vía han sido identificados en neuronas y/o glía (Nahorski, 1988; Fisher, 1992). Se ha observado hidrólisis de fosfoinosítidos en rebanadas de cerebro, en cultivos primarios, y en líneas celulares tanto neuronales como gliales (ver Fisher, 1992; Krsmanovic et al., 1991).

La hidrólisis de fosfoinosítidos en las neuronas parece tener efectos electrofisiológicos. Muchas neuronas responden a neurotransmisores que actúan por medio de la PLC, con una hiperpolarización transitoria (Fink y Kaczmarek, 1988). Esta hiperpolarización aparentemente está dada por un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, que a su vez parece facilitar la apertura de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} . Subsecuentemente la membrana se despolariza, aparentemente por el cierre de una conductancia de K^+ sensible a voltaje (corriente M). Esta conductancia parece estar controlada por DAG/PKC. Al parecer, algunas neuronas son capaces de secretar sus contenidos aún al estar hiperpolarizadas; esta acción se debe seguramente al Ca^{2+} liberado por el $Ins1,4,5P3$ (ver Fink y Kaczmarek, 1988). Sin embargo, no todas las neuronas responden al $Ins1,4,5P3$ con un aumento en la conductancia de K^+ dependiente de Ca^{2+} (ver Berridge, 1987; Fink y Kaczmarek, 1988; y Nahorski, 1988).

Otra posible acción del $Ins1,4,5P3$ en el sistema nervioso es la de modular los niveles de Ca^{2+} intracelular, y de esta manera ejercer una neuromodulación. En algunas células, el $Ins1,4,5P3$ posiblemente module ó ajuste los niveles de reposo de Ca^{2+} intracelular, de tal modo que con la entrada de más Ca^{2+} (por canales de Ca^{2+} operados por voltaje en respuesta a un estímulo), se alcance un nivel de Ca^{2+} igual ó superior al necesario para transpasar el nivel umbral requerido para provocar una secreción (ver Nahorski, 1988; Berridge, 1987), mismo que de otra manera no se podría alcanzar.

En el sistema nervioso, el receptor H1 también está acoplado a la hidrólisis de fosfoinosítidos. Se ha visto que este receptor está acoplado a la PLC en cultivos primarios gliales, en cultivos primarios hipotalámicos, en las líneas de neuroblastoma y NIE-115, y en las líneas de glioma y C6 (ver Fisher et al., 1992; Krsmanovic et al., 1991). Krsmanovic et al. (1991) demostraron también la producción de IPx en respuesta a endotelina en la línea neuronal GT1. Hasta donde sabemos, dicho estudio es

el único previo al nuestro en el que se ha medido la producción de IPx en esa línea celular.

El presente trabajo sugiere que la línea neuronal GT1 es un modelo ideal para estudiar la regulación neuroespecífica de la vía de la hidrólisis de fosfoinosítidos.

2.3- Control neuroendócrino de las funciones reproductivas: papeles de distintos neuromediadores en general, y de la histamina en particular, en la regulación de la secreción de GnRH por el hipotálamo.

-Consideraciones generales sobre la secreción de GnRH.

+)Importancia de la pulsatilidad de la secreción de GnRH.

La secreción de GnRH y de las gonadotropinas es pulsátil; de hecho, cada pico en los niveles periféricos de LH parece ser la consecuencia de un pico en los niveles de GnRH en la circulación porta (Clarke y Cummins,1982; Levine y Duffy, 1988). Estas oscilaciones parecen ser periódicas y sincrónicas.

La pulsatilidad de la secreción de GnRH es aparentemente necesaria para una respuesta adecuada de la hipófisis. Esto lo sugieren experimentos en los que la administración continúa de GnRH a células hipofisarias de rata en perfusión abate, a partir de 2 horas de tratamiento, la secreción de LH y FSH. Por otro lado, la administración de GnRH en la misma concentración, pero en forma pulsátil, tiene el efecto de provocar una secreción pulsátil de LH y FSH que se mantiene hasta 24 horas después de iniciado el tratamiento (Smith y Vale, 1981).

Haisenleder et al. (1993) reportan que la amplitud de los pulsos de LH secretados por células hipofisarias de rata en perfusión depende de la amplitud de los pulsos de GnRH aplicados al medio. Estos autores además reportan que la amplitud de los pulsos de GnRH también tiene el efecto de regular la síntesis de mRNA de las cadenas alfa y de las cadenas beta específicas para FSH y LH. Por ejemplo, al utilizar pulsos de GnRH con una amplitud de 70 pg/ml, se observa una cantidad de mRNA de la cadena beta de FSH dos veces más grande que la observada al aplicar pulsos de 175 pg/ml. La frecuencia de aplicación en ambos casos fue de 1 pulso/30 min.

El significado fisiológico de la secreción pulsátil de GnRH puede apreciarse al observar que es posible reestablecer la secreción de gonadotropinas en monos rhesus con lesiones en el núcleo arcuato (por lo tanto deficientes de GnRH), por medio de la administración intermitente de GnRH con una frecuencia fisiológica de 1 pulso/hr. La administración continúa del decapeptido provoca una respuesta muy tenue seguida de una aparente desensibilización de los gonadotropos. De hecho, mediante la

aplicación pulsátil de GnRH con una frecuencia invariante de 1 pulso/hr. se pudo lograr que algunos de esos animales tuvieran ciclos menstruales normales (Nakai et al., 1978). Esta observación, y otras, obscurecen el significado fisiológico del pico pre-ovulatorio de GnRH.

Estudios en mujeres con amenorrea hipogonadotrópica demuestran que la administración de GnRH en forma pulsátil induce la ovulación en la mayoría de ellas (70-90% de los casos). La amplitud y la frecuencia de los pulsos parecen ser factores fundamentales que determinan la respuesta. Ciertas combinaciones de estos dos parámetros fisiológicos son claramente más eficaces que otras (Filicori et al., 1989). Algo similar se puede observar en ovejas ovariectomizadas y en las que se ha desconectado al hipotálamo de la hipófisis. En estos animales también es posible ver un incremento en los niveles de LH, que corresponderían con el pico pre-ovulatorio, al aplicar GnRH en forma pulsátil. De manera parecida a lo observado en el estudio de Filicori et al., ciertas combinaciones de dosis de GnRH y de frecuencias de inyección son mucho más eficaces que otras para producir una respuesta adecuada (Clarke et al., 1990).

Por lo discutido anteriormente, resulta claro que la modulación de la amplitud, la frecuencia, y la duración de los pulsos de GnRH constituye un mecanismo de regulación fisiológica y cronobiológica muy importante. El cómo interpretan ó descodifican las células blanco en general la información contenida en la modulación de éstos parámetros es un tema muy interesante y aparentemente poco explorado. El estudio de este tipo de regulación probablemente tendría repercusiones clínicas importantes, sobre todo en los problemas relacionados con la infertilidad ó con el control de la natalidad.

+)El "generador de pulsos" de GnRH.

Tanto en el mono como en la rata el aislamiento, por medios quirúrgicos, del hipotálamo mediobasal, no elimina la secreción pulsátil de gonadotropinas. Esto sugiere que el mecanismo encargado de generar la secreción pulsátil de GnRH reside en esa parte del hipotálamo (Knobil, 1990a).

Al basarse en este hecho y en la suposición de que la liberación de GnRH es la consecuencia de la existencia de potenciales de acción en las neuronas GnRHérgicas, Knobil et al. (revisado en Knobil, 1990a, 1990b, y 1992) supusieron que un número relativamente grande de neuronas GnRHérgicas localizadas en el hipotálamo mediobasal (específicamente en la región del núcleo arcuato en el caso del mono rhesus) deberían despolarizarse más ó menos periódica y sincrónicamente, y que sería posible medir esa actividad neuronal.

En efecto, al introducir un electrodo de registro multiunitario a esta zona, se registró una actividad multiunitaria pulsátil. Este grupo observó un incremento en la cantidad de potenciales de acción aproximadamente cada hora, seguido, de manera periódica, por una actividad basal que se interrumpía para dar lugar a otro incremento en la actividad multiunitaria. Interesantemente, los picos de actividad multiunitaria se correlacionaron directamente con los picos de secreción pulsátil de LH detectados en la circulación (Fig.4) .

Estos incrementos pudieron haber sido provocados por un número relativamente pequeño ó fijo de neuronas con una frecuencia de disparo aumentada, ó por un número aumentado de neuronas con una frecuencia de disparo menor que la mencionada anteriormente.

La entidad encargada de generar esta actividad periódica, localizada en el hipotálamo mediobasal y definida con criterios electrofisiológicos, pudiera ser parte de, ó comprender totalmente a, otra entidad cuya existencia ha sido postulada desde hace muchos años y que se conoce como "generador de pulsos de GnRH" (ver Knobil, 1992).

La frecuencia del generador de pulsos parece poder ser modulada por una serie de factores, como las fases de los ciclos reproductivo y circadiano en la que se encuentre el animal estudiado, ó como la administración de diversas hormonas y neuromediadores, como se verá en esta sección.

El generador de pulsos ha sido identificado con criterios electrofisiológicos; sin embargo, hasta la fecha no se ha podido identificar el substrato anatómico preciso de dicha entidad. Por lo tanto, no se conoce con absoluta precisión en qué lugar reside el oscilador que genera los pulsos. Tampoco se sabe si dicho oscilador está conformado en su totalidad por neuronas GnRHérgicas, ó si éstas están acopladas a un oscilador u osciladores externos. Asimismo, se desconoce la naturaleza celular y molecular del generador de pulsos (ver Knobil 1990a, 1990b, 1992).

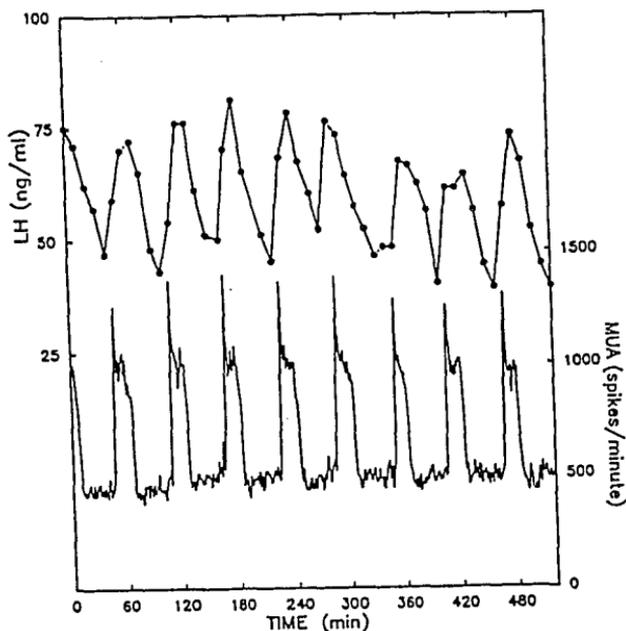


Fig.4. Curso temporal de la actividad electrofisiológica del "generador de pulsos de GnRH", y la correlación de ésta con el perfil de secreción de LH durante el ciclo menstrual en el mono rhesus. Ver texto (sección 2.3) para mayores detalles. (Tomado de Knobil, 1990. Electrophysiological approaches to the hypothalamic GnRH pulse generator. En "Neuroendocrine regulation of reproduction"; Yen, S.S.C., y Vale, W.W. eds. Serono Symposia USA, Norwell, MA, U.S.A.).

+)Propiedades intrínsecas de la secreción de GnRH.

Martínez de la Escalera et al. (1992c), Wetsel et al. (1992), y Krsmanovic et al. (1992), demostraron, de manera independiente, que las células GT1 son capaces de sincronizarse para generar, de manera intrínseca, pulsos de secreción de GnRH con una frecuencia parecida a la observada en ratas ovariectomizadas. Esta secreción es dependiente de los niveles de Ca^{2+} en el medio.

Krsmanovic et al. (1992) además demostraron la existencia de una secreción pulsátil e intrínseca de GnRH en explantes hipotalámicos, adultos y fetales, y en cultivos primarios de células hipotalámicas. Este grupo mostró que la amplitud de los pulsos de GnRH generados de manera intrínseca por explantes hipotalámicos adultos, cultivos primarios, y células GT1, disminuye considerablemente al aplicar nifedipina, un bloqueador de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje. Al menos en las células GT1, este efecto fue dependiente de la concentración. Por otro lado, la adición de Bay K 8644, que es un agonista de los canales de Ca^{2+} , estimuló significativamente en éstas últimas preparaciones la secreción de GnRH.

Estos investigadores también observaron que la despolarización, con alto K^+ , de explantes hipotalámicos adultos, cultivos primarios, y células GT1, produjo un incremento en la secreción, tal y como reportaron originalmente Mellon et al. (1990) en las células GT1. Al menos en estas células, dicho efecto fue bloqueado por la adición simultánea de nifedipina. La adición de este bloqueador a las células GT1 tuvo el efecto de disminuir considerablemente los niveles de Ca^{2+} intracelular.

Krsmanovic et al. (1992) concluyen que la secreción pulsátil de GnRH, al menos en las preparaciones empleadas, es producto de la despolarización espontánea y rítmica de las neuronas GnRHérgicas, y que la secreción está mediada por la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} operados por voltaje. De hecho, Martínez de la Escalera et al. (1992c) ya habían demostrado que la presencia de Ca^{2+} en el medio de incubación de las células GT1 es necesario para la secreción pulsátil de GnRH.

La actividad intrínseca de las distintas preparaciones empleadas en el estudio de Krsmanovic et al. (1992), así como la de las células GT1 (Ibid.; Martínez de la Escalera et al., 1992c; Wetsel et al., 1992) posiblemente refleje lo que ocurre *in vivo*. Si esto fuera así, se podría pensar que muy probablemente la identidad del generador de pulsos de GnRH reside en las mismas neuronas GnRHérgicas, y que esas células

contienen mecanismos necesarios y suficientes para generar oscilaciones periódicas en los niveles circulantes de la hormona.

El estudio de los mecanismos responsables de la generación y sincronización de pulsos de GnRH seguramente dará mucha luz acerca de los fenómenos oscilatorios que ocurren en los seres vivos. En este contexto, las células GT1 serían un importante modelo para estudios cronobiológicos.

-Control neuroendócrino de las funciones reproductivas.

+ Neuromediadores peptídicos.

Algunos estudios sugieren que la GnRH tiene un efecto autorregulador sobre su propio metabolismo al ejercer una retroalimentación negativa de asa ultracorta (e.g. DePaolo et al., 1987; Sarkar, 1987). El grupo de Krsmanovic et al. (1993) demostró la presencia de receptores de GnRH en las células GT1. La periferfusión de estas células con agonistas GnRHérgicos tiene distintos efectos sobre la secreción del decapeptido. Al principio hay un aumento en la secreción, seguido del abatimiento de la secreción pulsátil basal; a continuación se inducen pulsos de menor frecuencia pero de mayor amplitud, y finalmente se pueden observar episodios aislados en los que se secreta una gran cantidad de hormona (ibid.). Este estudio sugiere la existencia de acciones autócrinas directas de la hormona sobre las neuronas que la secretan.

El mismo grupo (Krsmanovic et al., 1991) reportó la producción de endotelina, un péptido originalmente identificado en células endoteliales (Yanagisawa et al., 1988), en cultivos primarios hipotalámicos. En ese estudio se demostró también la presencia de receptores de endotelina tanto en los cultivos hipotalámicos como en células GT1. Al menos en esas dos preparaciones, la unión de la endotelina con sus receptores estimula la hidrólisis de fosfoinosítidos y la producción de IP₃, así como la secreción de GnRH. Este fue el primer trabajo en el que se determinó la producción de IP₃ en las células GT1.

La endotelina también tiene efectos sobre la secreción de gonadotropinas por la hipófisis. De hecho, la potencia del péptido para provocar secreción de LH en la hipófisis es comparable a la de GnRH. Probablemente la endotelina también juegue un papel importante a ese nivel (Stojilkovic et al., 1990).

La activina-A, una protefna parecida a la inhibina, también estimula la secreción de GnRH en la línea GT1 (González-Manchón et al., 1991).

Dentro de los neuropéptidos, se ha postulado que al menos 30 de ellos participan en la regulación de la producción de gonadotropinas (ver Weiner et al., 1988). Entre ellos se encuentran:

- Somatostatina (SS14 y SS28).
- Substancia P.
- Neurocininas A y B.
- Neurotensina.
- Factor natriurético atrial.
- Neuropéptido Y.
- Péptido YY.
- Péptido pancreático.
- Galanina.
- Oxitocina.
- Vasopresina.
- TRH.
- CRH.
- Colecistocininas.
- VIP.
- Glucagon.
- GHRH.

Para una revisión más extensa del tema, ver Weiner et al. (1988). Los péptidos opioides, que al parecer también juegan un papel importante, se discutirán a continuación.

++) Péptidos opioides.

Los péptidos opioides se generan aparentemente a partir de tres precursores distintos, cada uno de los cuales es codificado por su propio gen. Estos precursores son:

-La proencefalina A, que da origen, entre otros, a la Met-encefalina y la Leu-encefalina;

- la dinorfina ó proencefalina B, que genera a las dinorfinas A y B, entre otros; y
- La POMC, que da origen a la beta-END.

Cada tipo de precursor parece ser sintetizado por y en un sistema neuronal específico. Los tres sistemas parecen estar representados en el hipotálamo; en el área preóptica y en la eminencia media existe una alta densidad de receptores a opioides (ver Bicknell, 1985). Existen al menos tres tipos de receptores de opioides, denominados kappa, delta y mu. Los opioides derivados de la proencefalina A se unen preferencialmente a los receptores delta; aquellos derivados de la prodinorfina se unen preferentemente a los receptores kappa, y los producidos a partir de la POMC se unen principalmente a los receptores delta y mu.

Estos péptidos participan, al parecer de manera importante, en la regulación de la actividad de varios tipos de neuronas neuroendócrinas. Una serie de trabajos, que comienzan en 1955 (ver Bicknell, 1985), sugieren que los opioides endógenos participan en el control de la secreción de GnRH al ejercer una inhibición tónica sobre las neuronas GnRHérgicas (e.g., Drouva et al., 1981; ver Weiner et al., 1988). Como ejemplo de lo anterior está la observación de que en monos rhesus ovariectomizados, la aplicación de morfina elimina significativamente el funcionamiento del generador de pulsos de GnRH. Esta acción es bloqueada por la adición simultánea de naloxona, un antagonista mu opioidérgico. La administración de naloxona sola no tiene efectos distinguibles sobre el generador de pulsos en estos animales (Knobil, 1990a).

Lo anterior sugiere que en ausencia de las gónadas (y de los esteroides sexuales), los opioides tienen un efecto inhibitor tónico prácticamente inexistente sobre la secreción de GnRH. Probablemente los opioides y los esteroides sexuales interactúan para regular inhibidoramente a la secreción de GnRH.

Por otro lado, Levine et al. (1990) reportan que la administración de naloxona a ratas tanto intactas como gonadectomizadas tiene el efecto de aumentar la frecuencia y la amplitud de los pulsos de GnRH y de LH. En un estudio parecido, Laposavic et al. (1991) demostraron que una sola inyección de naloxona, pero no una de ICI 174864 (un antagonista delta opioidérgico) ni otra de MR2266 (un bloqueador kappa opioidérgico), a ratas adultas produce una hipersecreción de LH y de testosterona en los animales experimentales.

En el mismo estudio, se probó el efecto de los tres bloqueadores sobre la secreción de GnRH por hipotálamos *in vitro* obtenidos de ratas adultas e inmaduras. La adición de naloxona provoca en ambas preparaciones un incremento en la secreción del decapeptido, mientras que la aplicaciones de ICI 174864 y de MR2266 tienen un efecto muy pequeño. La aplicación simultánea de naloxona y de alfuzosina (un antagonista alfa-adrenérgico) suprime el efecto estimulador de la primera, mientras que la administración de alfuzosina sola no tiene ningún efecto sobre la secreción de GnRH (Leposavic et al., 1991).

Lo anterior sugiere que los efectos inhibidores de los péptidos opioides se ejercen, al menos de manera indirecta, por medio de la unión de éstos a receptores mu presentes en neuronas reguladoras de las funciones reproductivas. Esta unión bloquearía, de manera tónica, la actividad (estimuladora ó por lo menos permisiva ó facilitadora), de neuronas adrenérgicas, y muy probablemente de otros tipos de neuronas. En este sentido, hasta la fecha no existen estudios relacionados con la posible existencia de receptores opioidérgicos en neuronas GnRHérgicas; seguramente este aspecto se estudiará en la línea GT1.

La noción mencionada arriba está apoyada por la observación de que varios antagonistas alfa-adrenérgicos, así como inhibidores de la síntesis de noradrenalina, bloquean la estimulación de la secreción de LH provocada por naloxona (ver Bicknell, 1985); así como por el hecho de que un número de neuronas adrenérgicas poseen terminales que terminan cerca de neuronas GnRHérgicas en la región preóptica.

Por otro lado, Masotto et al. (1989) reportaron que la adición de baclofén (un agonista GABA_B) a fragmentos de hipotálamo de rata que incluyen al núcleo arcuato y a la eminencia media incubados *in vitro*, tiene el efecto de bloquear la estimulación de la secreción de GnRH provocada por naloxona. Este efecto inhibitor del baclofén fue contrarrestado por la adición simultánea de 5-aminovalerato, un fármaco que aparentemente bloquea el efecto inhibitor del baclofén sobre la secreción de NE por terminales noradrenérgicas. Este efecto no fue bloqueado por la adición simultánea de bicuclina, un antagonista GABA_A. La adición de baclofén solo no tuvo ningún efecto sobre la secreción de GnRH (Ibid).

Estos resultados sugieren que algunas neuronas GABAérgicas co-participan con neuronas opioidérgicas en la regulación, principalmente inhibidora, de las neuronas adrenérgicas que modulan a su vez la secreción de GnRH. Probablemente esta acción está mediada por receptores GABA_B. En el área preóptica medial/anterior del

hipotálamo de la rata existen neuronas GABAérgicas que concentran estrógenos (Flugge et al., 1986). Quizá estas neuronas medien algunos de los efectos de los estrógenos al inhibir a las neuronas adrenérgicas ya mencionadas.

Por último, los opioides endógenos parecen mediar, al menos en parte, los efectos reguladores de los esteroides sexuales sobre la secreción y quizá la síntesis de GnRH. Algunas neuronas opioidérgicas situadas en el hipotálamo tienen receptores de estrógenos (ver Bicknell, 1985). Esta noción es apoyada por los hallazgos del grupo de Knobil (1990b), en relación a los efectos de la naloxona sobre el generador de pulsos de GnRH en monos rhesus gonadectomizados.

+)Esteroides sexuales.

Los esteroides sexuales ejercen sus efectos principalmente al controlar, mediante su unión a receptores específicos y la consecuente activación de éstos, la transcripción de genes que poseen secuencias reguladoras susceptibles de ser reconocidas por estos complejos. El curso temporal de este efecto es relativamente largo (de horas a días). Sin embargo, los esteroides aparentemente median respuestas mucho más rápidas: durante la fase de proestro en la rata, los niveles de estrógenos se elevan considerablemente, seguidos, al cabo de solo unas cuantas horas, por el pico de secreción de LH. Los estrógenos, en esa fase, ejercen una retroalimentación positiva sobre los niveles de GnRH y de LH.

Otro ejemplo de respuesta rápida, es la observación de que la adición de estradiol a hipotálamos mediobasales periperfundidos *in vitro* tiene la consecuencia de elevar, en 10 minutos, la liberación de GnRH (Miyake et al., 1987).

Los esteroides sexuales parecen jugar un papel muy importante en el control de las funciones reproductivas. Se han reportado efectos de retroalimentación positiva y negativa de estas hormonas sobre la producción de GnRH (ver Fink, 1988); esto plantea, aparentemente, una paradoja.

Posiblemente el tipo de retroalimentación esté determinado por la ubicación del animal dentro de su ciclo reproductivo, al menos en el caso de las hembras. Lo más probable es que los mecanismos por los cuales los esteroides sexuales ejercen sus efectos sean muy complejos e involucren un gran número de elementos, redes neuronales, e interacciones con otros neuromediadores. Es posible plantear

mecanismos hipotéticos por medio de los cuales explicar los efectos positivos y negativos de estas hormonas, sin incurrir en paradojas.

El efecto más directo de los estrógenos sobre la síntesis de GnRH consistiría en su control directo de la síntesis del decapeptido en las neuronas GnRHérgicas. Sin embargo, estas células aparentemente no concentran estradiol (Shivers et al. 1983). Contrastantemente, Radovick et al. (1991) demostraron, mediante estudios de transfección, que el gen de GnRH contiene una secuencia ERE. Estos estudios consistieron en la construcción de vectores de expresión que contenían varias secuencias pertenecientes a la región 5' del gen de GnRH humano, seguidas en la dirección 3' por un gen reportero. Con estos vectores se transfectó a células JEG-3 (una línea de coriocarcinoma humano), y se midió la actividad del gen reportero en respuesta a tratamiento con varias concentraciones de estradiol.

Además, se hicieron estudios de "huellas digitales" ó *footprinting*, con el empleo de DNasa I y un receptor de estrógenos bovino. Estos análisis confirmaron la existencia del ERE en el gen de GnRH. El ERE está situado entre -547 y -516 bp. Esto indica que la posibilidad existe de que la GnRH sea regulada directamente por los estrógenos.

Por otro lado, se ha observado que las neuronas GnRHérgicas son susceptibles de sufrir cambios morfológicos en respuesta a fluctuaciones en los niveles de esteroides gonadales presentes en el líquido intersticial que las baña (Witkin et al. 1991).

En el área preóptica/anterior del hipotálamo existen neuronas GABAérgicas que concentran estrógenos (Flugge et al 1986). Quizá el GABA participe como intermediario en la regulación de la GnRH por los estrógenos, posiblemente al inhibir a las neuronas adrenérgicas mencionadas en la sección precedente, y seguramente al modular, inhibidoramente, la actividad de otras interneuronas que a su vez regulan (excitadora ó inhibidoramente) a las neuronas GnRHérgicas.

Los aminoácidos endógenos excitadores, como el glutamato, también parecen jugar un papel importante en la mediación de los efectos de los estrógenos. Por ejemplo, la aplicación de MK801 (un antagonista de los receptores tipo NMDA) a ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos, abate la capacidad de la progesterona de inducir picos de LH y FSH en estos animales (Brann y Mahesh 1991a; Brann y Mahesh 1991b).

Al parecer, los efectos de los esteroides gonadales sobre la secreción de GnRH también están mediados por neuronas opioidérgicas: algunos de los efectos ejercidos

por dichos esteroides sobre la secreción de LH pueden ser revertidos mediante el tratamiento con naloxona. Además, en el hipotálamo mediobasal es posible encontrar neuronas que concentran estrógenos y que al mismo tiempo contienen beta-END ó dinorfina (ver Bicknell, 1985).

También se ha implicado a los sistemas dopaminérgicos, noradrenérgicos, y serotoninérgicos en la mediación del control que ejercen los esteroides gonadales sobre la GnRH (ver Bicknell, 1985). Ohtsuka et al. (1989) demostraron que en un sistema de perfusión de hipotálamos mediobasales de rata *in vitro*, la adición de estradiol al medio de perfusión provoca un incremento grande (>70%) en los niveles de secreción tanto de GnRH como de NE, DA e HA. La adición de HA no estimuló la secreción de las catecolaminas, ni la adición de éstas estimuló la secreción de HA. Estos autores habían previamente demostrado que la adición de NE ó HA estimula la secreción de GnRH en el hipotálamo mediobasal (Miyake et al., 1987). Por lo tanto, concluyen que el estradiol estimula la secreción de NE e HA, mismas que a su vez estimulan la secreción de GnRH (Ohtsuka et al., 1989). De esta manera, el sistema histaminérgico también se ve relacionado con la mediación de las acciones regulatorias de los esteroides sexuales.

+) Monoaminas y otros neurotransmisores.

Sobre este tema también hay una gran abundancia de estudios, que a menudo son controversiales entre sí (ver Weiner et al., 1988). Prácticamente todos los principales neurotransmisores conocidos han sido implicados en la regulación de la GnRH por medio de una complicada red de impulsos aferentes. En esta sección discutiremos los papeles de las catecolaminas (DA, E y NE), de la 5-HT, y de los aminoácidos excitadores e inhibidores endógenos y exógenos (como glutamato y GABA). La HA se discutirá en la siguiente sección.

++) Catecolaminas.

En el hipotálamo están presentes fibras, de origen extrínseco, que contienen NE. Algunas de éstas terminan cerca de neuronas que contienen GnRH en el área preóptica. Un número de estas fibras hacen sinapsis, aparentemente, con neuronas GABAérgicas (ver Weiner et al., 1988).

La innervación adrenérgica del hipotálamo también es extrínseca. Es posible observar una alta concentración de E en distintos núcleos hipotalámicos, tales como el arcuato, supraóptico, paraventricular, etc. (ibid.).

En el hipotálamo están también presentes neuronas dopaminérgicas; los cuerpos celulares de algunas de ellas se encuentran en el núcleo arcuato. Las terminales de éstas últimas terminan cerca de los capilares del sistema porta hipofisiario en la eminencia media, donde podrían interactuar con terminales GnRHérgicas. Estas neuronas pueden además secretar dopamina a la circulación porta (ver Weiner et al., 1988).

+++ E y NE.

La administración de bloqueadores alfa-adrenérgicos a monos rhesus ovariectomizados disminuye en ellos las frecuencias del así llamado generador de pulsos de GnRH, y de los consecuentes pulsos de LH (referido en Knobil, 1990a). En estos animales, la aplicación de propranolol, un bloqueador beta-adrenérgico, no tuvo ningún efecto.

En ratas ovariectomizadas, la administración de bloqueadores de la síntesis de NE ó de bloqueadores alfa, ó la destrucción de las vías noradrenérgicas provenientes del tallo cerebral, tienen el efecto de suprimir la secreción pulsátil de LH. El bloqueo con propranolol de los receptores beta no suprime la secreción de LH. En estos animales, la aplicación de clonidina (un agonista alfa) restituye la secreción pulsátil de LH interrumpida por el tratamiento con FLA-63 (un inhibidor de la síntesis de NE) (ver Weiner et al., 1988; Levine et al., 1990).

Las neuronas que contienen E aparentemente no participan en la regulación de la secreción de GnRH, ya que la inhibición de la síntesis de ese compuesto no tiene ningún efecto sobre la secreción pulsátil de LH (ibids.).

Martínez de la Escalera et al. (1992b) demostraron que en la línea neuronal GT1, la NE es capaz de estimular la secreción de GnRH por medio de receptores beta-1 adrenérgicos acoplados positivamente a la adenilato ciclasa. En estos estudios, la estimulación noradrenérgica de la secreción del decapeptido no se vio bloqueada por la adición simultánea de bloqueadores beta-2, alfa, alfa-1 y alfa-2, pero sí por la adición de propranolol ó de CGP 20712A (un antagonista selectivo beta-1). La acción de la NE fue mimetizada por el isoproterenol (un agonista beta).

La producción de cAMP fue estimulada por la presencia de isoproterenol, e inhibida por la aplicación tanto de propranolol como de CGP 20712A; la aplicación conjunta de NE e ICI 118.551 (un antagonista selectivo beta-2) no tuvo ningún efecto sobre la estimulación del cAMP por NE.

Además, se ha demostrado, de manera independiente, la existencia de receptores funcionales beta-1 acoplados positivamente a la adenilato ciclasa en esta línea neuronal (Findell et al., 1993; Martínez de la Escalera et al., 1992b). La activación experimental de esta vía de comunicación intracelular mediante la aplicación de forskolina también produce un incremento en la secreción de GnRH en las células GT1 (Wetsel et al., 1993).

Los estudios mencionados en esta sección sugieren que la NE, y quizás la E, podrían tener un efecto directo sobre la regulación de las neuronas GnRHérgicas, probablemente por medio de sinapsis entre éstas últimas y neuronas noradrenérgicas. Esta regulación parecería estar mediada por receptores beta-1, aunque algunos trabajos sugieren que los efectos de estas catecolaminas están mediados por receptores alfa, específicamente alfa-1. Las neuronas adrenérgicas están también involucradas como mediadoras de las acciones de los péptidos opioides y de los esteroides sexuales sobre la síntesis y secreción de GnRH.

En resumen, de un gran número de estudios parece desprenderse la conclusión de que la NE, y quizás la E, participan de manera importante en la regulación de las funciones reproductivas.

+++)-DA

Knobil et al. (referido en Knobil, 1990a) observaron que el bloqueo dopaminérgico, al igual que el adrenérgico, disminuye la frecuencia de los pulsos tanto del generador de GnRH como los de secreción de LH. Sin embargo, por razones ya mencionadas es difícil precisar si los efectos de estos compuestos son directos ó indirectos.

El papel que juega la DA en la regulación de los pulsos de LH no está claro (ver Weiner et al., 1988). Recientemente, Martínez de la Escalera et al. (1992a) demostraron que la DA estimula la secreción de GnRH por medio de receptores D1 acoplados positivamente a la adenilato ciclasa en la línea neuronal GT1. Estos investigadores, y el grupo de Findell et al. (1993), demostraron independientemente, por medio de estudios de expresión ó *Northern blot* y de cinética de unión ó *binding*, la presencia de

receptores funcionales D1 acoplados positivamente a la adenilato ciclasa en estas células.

++) 5-HT.

Al igual que con las catecolaminas, se han reportado efectos positivos y negativos de la 5-HT sobre la secreción de LH. Aparentemente, el tipo de efecto depende de las concentraciones de estrógenos, al menos en las ratas hembras (ver Weiner et al., 1988).

++) Aminoácidos excitadores e inhibidores.

+++) Aminoácidos excitadores:

Existen varios trabajos que sugieren que los neurotransmisores excitadores, al actuar por medio de receptores específicos, participan de manera importante en la regulación de la secreción de LH. El L-Glu es considerado como el principal neurotransmisor excitador del SNC. Al parecer, otros aminoácidos endógenos también participan en este tipo de neurotransmisión. Entre ellos se encuentran los ácidos homocistéico, quinoléico y piroglutámico.

Aparentemente, existen distintos tipos de receptores de L-Glu; algunos son metabotrópicos y otros ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos son aquellos que al ser activados producen un cambio en el metabolismo celular, normalmente al activar alguna vía de comunicación intracelular; los receptores ionotrópicos generalmente facilitan el tránsito de iones a través de la membrana plasmática. Estos últimos generalmente son canales iónicos operados por ligando, es decir, proteínas que funcionan como receptor y canal iónico al mismo tiempo.

Los receptores pueden ser activados selectivamente por distintos ligandos, que generalmente son aminoácidos exógenos, y se han clasificado en 5 clases:

1-Los receptores sensibles a NMDA, que funcionan como canales de Ca^{2+} operados por ligando;

2-los receptores sensibles al ácido kaínico, involucrados en la neurotransmisión rápida;

- 3-los receptores sensibles al AMPA, que también son sensibles al ácido quisquálico;
- 4-los receptores reconocidos por el L-AP4, involucrados en la inhibición de la transmisión sináptica en algunas regiones del cerebro; y
- 5-los receptores metabotrópicos, que son activados por el quisqualato y por el trans-ACPD.

La activación de esta última clase de receptores está aparentemente acoplada a la hidrólisis de fosfoinosítidos.

López et al. (1992) probaron los efectos y potencias de distintos aminoácidos excitadores, endógenos y exógenos, sobre la secreción de GnRH por fragmentos hipotalámicos que comprendieron al núcleo arcuato y la eminencia media in vitro. Estos autores observaron que AMPA > ácido homocistéico > ácido quinolínico > ácido pirolutámico. Lo anterior sugiere que, en esta zona del hipotálamo, los receptores de tipo no-NMDA son los principales involucrados en la mediación de la respuesta. En este estudio se indica que el trans-ACPD no tiene ningún efecto sobre la secreción de GnRH.

Por otro lado, Bourignon et al. (1989a,1989b) demostraron que la secreción pulsátil y espontánea de GnRH por explantes hipotalámicos de rata in vitro puede ser abatida mediante la administración de MK-801, un antagonista potente y específico de los receptores tipo NMDA. La secreción de GnRH no pudo ser bloqueada al adicionar 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona, un bloqueador selectivo de los receptores de quisqualato y kainato. Estos autores concluyen que el L-Glu participa directamente sobre la secreción de GnRH, mediante receptores tipo NMDA.

En estudios in vivo, Brann y Mahesh (1991a, 1991b) mostraron que la administración de MK-801 a ratas intactas ciclantes en la fase de proestro provoca una marcada reducción de los picos de LH y FSH. En este mismo estudio se observó que el MK-801 inhibe la capacidad de la progesterona de generar picos de gonadotropinas en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos. También se observó que el NMDA provoca un aumento en las cantidades de LH y FSH detectadas en plasma, en ratas inmaduras ovariectomizadas y tratadas con estrógenos (ibids.).

En otros estudios se ha observado que inyecciones de NMDA a monos rhesus machos prepúberes, tienen el efecto de aumentar la secreción de GnRH (Medhamurty et al. 1992).

Recientemente se ha demostrado en la línea GT1-1 que el NMDA estimula la secreción de GnRH. Estas células además presentan el mRNA del receptor a NMDA (Mahachoklertwattana et al., comunicación personal); lo que sugiere que *in vivo* muy probablemente el L-Glu ejerza acciones directas en la regulación de las neuronas GnRHérgicas.

Todos estos estudios sugieren que el NMDA participa de manera importante en la regulación de la secreción de GnRH.

Parece existir comunicación cruzada ("*cross-talk*") entre las vías de los aminoácidos excitadores e inhibidores en la regulación de la secreción de GnRH. Donoso et al. (1992) mostraron, en fragmentos hipotalámicos *in vitro*, que el muscimol (un agonista GABA_A), tiene el efecto de estimular la secreción de GnRH, al igual que el L-Glu. Al aplicar simultáneamente muscimol y L-Glu, la estimulación observada parece ser la suma de las estimulaciones producidas por cada uno de los compuestos por separado.

En estos estudios, no se observó ningún cambio en la secreción de GnRH al agregar bicuculina sola (antagonista GABA_A) a los fragmentos. Sin embargo, la adición simultánea de bicuculina y L-Glu tuvo el efecto de eliminar la estimulación provocada por este último. Por otro lado, la aplicación simultánea de L-Glu y baclofén (un agonista GABA_B) provocó, de manera parecida, una disminución en la secreción de GnRH hasta niveles controles. Este efecto pudo ser revertido al añadir también baclofén (un antagonista GABA_B).

Al parecer, existen efectos reguladores estimuladores e inhibidores del GABA sobre las neuronas glutamatérgicas (y viceversa, probablemente), cada uno mediado por un tipo específico y distinto de receptor. Esto sugiere que los sistemas de aminoácidos excitadores que intervienen en la regulación de la secreción de GnRH están modulados por neuronas GABAérgicas. Estas últimas parecen modular también a otros sistemas de neurotransmisores involucrados en la regulación de la GnRH, y mediar los efectos de retroalimentación de los esteroides gonadales.

En conclusión, los aminoácidos excitadores también juegan un papel importante en la regulación de las funciones reproductivas. Muy probablemente esta acción está mediada por receptores tipo NMDA, aunque no se puede descartar la participación de

otros tipos de receptores. Es probable que este sistema esté modulado a su vez por neuronas GABAérgicas, con las que parecen tener comunicación cruzada.

+++) Aminoácidos inhibidores.

El GABA es considerado como el principal neurotransmisor inhibidor del SNC. En el hipotálamo existen numerosas neuronas que contienen a la descarboxilasa del ácido glutámico, una enzima que participa en la biosíntesis del GABA. Se ha demostrado que algunas de esas neuronas establecen contactos sinápticos con neuronas GnRHérgicas en las áreas preóptica medial/anterior del hipotálamo (ver Weiner et al., 1988). Se considera que el GABA participa de manera importante en la regulación de la secreción de GnRH. Posiblemente, las neuronas GABAérgicas ejerzan esta acción mediante sus contactos sinápticos con las neuronas GnRHérgicas. Además, en muchos modelos, las neuronas GABAérgicas ejercen un efecto inhibitor tónico sobre la actividad de otras neuronas (e.g., noradrenérgicas) que a su vez regulan a las neuronas GnRHérgicas.

En el área preóptica/anterior del hipotálamo existen neuronas GABAérgicas receptivas a estrógenos (Flugge et al. 1986). Probablemente estas neuronas medien los efectos reguladores que tienen los estrógenos en la secreción de GnRH. Ya se mencionó que el baclofén es capaz de inhibir la secreción de GnRH provocada por naloxona en fragmentos hipotalámicos *in vitro*. Esta inhibición puede ser revertida por la adición de 5-aminovalerato (que antagoniza el efecto del baclofén sobre la secreción de NE *in vitro*) (Masotto et al., 1989). Esto indica que, probablemente, las neuronas GABAérgicas ejercen un control, junto con neuronas opioidérgicas, sobre neuronas noradrenérgicas que participan en la regulación de las neuronas GnRHérgicas. El control sobre las neuronas noradrenérgicas parece estar mediado por receptores GABA_B.

Por otro lado, este mismo grupo también reporta que el GABA y el muscimol tienen el efecto de aumentar la secreción de GnRH significativamente; la aplicación simultánea de muscimol y bicuculina tiene el efecto de bloquear la estimulación (Masotto et al., 1989). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Donoso et al. (1992) relacionados con los posibles efectos de comunicación cruzada entre el glutamato y el GABA.

In vivo, inyecciones intraventriculares de baclofén primero detienen la secreción pulsátil de LH. Al cabo de un tiempo se restituye ésta pero disminuye la frecuencia e incrementa la amplitud (Akema y Kimura, 1992). Otros estudios también indican que el GABA ejerce influencias inhibitorias sobre la secreción pulsátil de LH (ver Weiner et al., 1988).

En las células GT1, Hales et al. (Comunicación personal) han demostrado que el GABA tiene efectos excitadores directos sobre la secreción de GnRH. Mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas, estos autores observan que la adición de GABA produce potenciales de acción. En las células GT1, el potencial electroquímico del Cl^- parece ser tal que la apertura de canales de Cl^- operados por GABA tiene la consecuencia de generar una corriente de ese anión hacia afuera de la célula, lo que provoca una despolarización suficiente para llegar al umbral necesario para la generación de un potencial de acción. La apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje posiblemente tiene la consecuencia de provocar un episodio de secreción.

En este sentido, Martínez de la Escalera et al. (1994), también con las células GT1, demostraron un efecto bifásico del GABA sobre la secreción de GnRH. La adición de GABA provoca un aumento en la secreción de GnRH, que es seguido inmediatamente por una disminución en la amplitud de los pulsos espontáneos de secreción del decapeptido, y la posterior desaparición de éstos. La adición de muscimol tuvo el efecto de estimular la secreción, tal y como reportan Masotto et al. (1989) en fragmentos hipotalámicos, mientras que la de baclofén tuvo el efecto de inhibir la secreción pulsátil de GnRH.

Estos autores concluyen que existe la posibilidad de que el GABA tenga una doble acción sobre la secreción de GnRH: una excitadora y rápida, mediada por receptores GABA_A , y otra inhibitoria y relativamente más lenta, mediada por receptores GABA_B .

En conclusión, las neuronas GABAérgicas parecen tener acciones directas sobre las neuronas GnRHérgicas, como lo sugieren los hechos de que ambos tipos de células establecen contactos sinápticos entre sí, y de que el GABA tiene distintos efectos directos sobre las células GT1. Además, las neuronas GABAérgicas muy probablemente median y/o modulan, al regular la actividad de distintas neuronas, los efectos de otros neuromedadores sobre la secreción de GnRH. El ó los tipos de receptores GABAérgicos presentes en las células postsinápticas también parece ser un elemento determinante en cuanto al tipo de efecto provocado por el GABA.

Es posible que, in vivo, las neuronas GABAérgicas que hacen sinapsis con las neuronas GnRHérgicas, estimulen y/o inhiban directamente a estas últimas. Si estas acciones fueran cíclicas, posiblemente el GABA podría funcionar como un sincronizador de las oscilaciones de las secreciones de las neuronas GnRHérgicas.

+)HA.

++)Consideraciones generales.

La HA es una amina biogénica que está asociada con células cebadas presentes en casi todos los tejidos. En éstos, la HA tiene un número importante de acciones biológicas (Hill, 1990). La HA también se encuentra presente en el SNC, donde ha sido postulada como un neurotransmisor ó neuromodulador (ver Wada et al., 1991; Prell y Green, 1986; Rusell et al., 1990; Hill, 1990).

La HA es sintetizada a partir del aminoácido esencial L-histidina por la L-histidina descarboxilasa, y es inactivada mediante su conversión a tele-metilhistamina por la histamina metiltransferasa. Al parecer, la HA es el único sustrato endógeno de esta última enzima. La tele-metilhistamina puede ser subsecuentemente desaminada oxidativamente para convertirse en ácido tele-metilimidazolacético; esta reacción está catalizada principalmente por la monoaminooxidasa B (ver Prell y Green, 1986).

Las primeras acciones biológicas de la HA fueron descritas a principios de siglo (ver Parsons, 1991). Dentro de éstas se pueden contar la contracción de varios músculos (e.g. de los tractos gastrointestinal y respiratorio), la disminución de la presión arterial en animales experimentales, y la estimulación de la secreción de ácido gástrico, entre otras.

La HA tiene un número de acciones en el SNC (ver Wada et al., 1991). Este compuesto se halla también involucrado, de manera importante, con el sistema inmune.

La HA juega un papel importante en procesos inflamatorios y en alergias. Este hecho motivó la búsqueda de compuestos que antagonizaran las acciones de la HA en esas reacciones. Los primeros de ellos en ser desarrollados fueron los así llamados antihistamínicos clásicos. Actualmente se sabe que los antihistamínicos antagonizan la acción de la HA sobre un tipo de receptor, farmacológicamente identificado y denominado H1. A partir del desarrollo de esos primeros fármacos, se han desarrollado

otros antagonistas más potentes, como la pirilamina (también conocida como mepiramina) y la difenhidramina, además de algunos agonistas (ver Hill, 1990).

Sin embargo, los antihistamínicos no son capaces de bloquear todos los efectos farmacológicos de la HA, como por ejemplo la secreción de ácido gástrico estimulada por HA, ó la contracción del útero de rata aislado. Esta observación, y la analogía con los receptores adrenérgicos, llevó a la postulación de la existencia de un segundo tipo de receptor de HA.

El desarrollo de fármacos específicos, como la burimamida, capaces de bloquear aquellas respuestas a HA no antagonizadas por los antihistamínicos clásicos, hizo posible determinar farmacológicamente la existencia de un segundo tipo de receptor a HA, que fue denominado H₂. A partir de entonces, se han desarrollado fármacos que agonizan ó antagonizan, con una mayor especificidad y selectividad, los efectos de la HA sobre los receptores H₂ (ver Parsons, 1991; Hill, 1990).

Más ó menos recientemente se ha identificado farmacológicamente un tercer tipo de receptor de HA. Este fue originalmente encontrado en el SNC, donde aparentemente funciona como autorreceptor presináptico al modular la secreción de HA y probablemente de otros neurotransmisores. El receptor H₃ también se encuentra en órganos periféricos (ver Parsons, 1991; Hill, 1990; Pollard et al., 1993; Mitsuhashi y Payan, 1992).

Con respecto al arsenal farmacológico disponible para el estudio de los distintos receptores histaminérgicos, existe un número relativamente grande de agonistas y antagonistas de los receptores H₁, H₂ y H₃. Salvo en el caso de los agonistas H₁, que no presentan una especificidad alta, los demás compuestos exhiben una relativamente alta especificidad, selectividad, y potencia relativa a la HA (tabla 1).

En el caso de los receptores H₁, los principales agonistas son la 2-metilhistamina y la 2-tiazoliletilamina. Los principales antagonistas son la pirilamina, la (-)-clorfeniramina, y la trans-triprolidina. En cuanto a los receptores H₂, los principales agonistas son la 4-metilhistamina, el dimaprit, y la impromidina. Los principales antagonistas, algunos de los cuales son usados clínicamente en el tratamiento de la úlcera péptica, son la cimetidina (Tagamet), la ranitidina (Azantac) y la zolantidina; este último es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. Con respecto a los receptores H₃, el principal agonista es la R-(alfa)-metilhistamina, y el principal antagonista es la tioperamida (Fig.5).

Antagonist	K _D (nM)		
	H ₁	H ₂	H ₃
Mepyramine	0.8 ^a	5,200 ^b	>3,000 ^c
Cyclizine	5.0 ^d	1,600 ^e	>580 ^f
(+)-Chlorpheniramine	0.4 ^g	1,200 [†]	>58 ^f
(-)-Chlorpheniramine	204 ^g		>58 ^f
Cimetidine	450,000 ^h	800 ^h	33,000 ^c
Ranitidine	>100,000 ⁱ	200 ⁱ	>1,200 ^f
Tiotidine	>30,000 ^j	15 ^k	17,000 ^c
Burimamide	290,000 ^l	7,800 ^l	70 ^f
Impromidine	Agonist ^f	Agonist ^f	65 ^f
Thioperamide	>100,000 ^m	>10,000 ^m	4.3 ⁿ

* Source of data: ^a Hill and Young (1981), ^b Trendelenburg (1960), ^c Arrang et al. (1985c), ^d Ganellin (1982), ^e Johnson et al. (1979b), ^f Arrang et al. (1983), ^g Hill et al. (1981), ^h Brimblecombe et al. (1975), ⁱ Cavannagh et al. (1983), ^j Donaldson et al. (1988b), ^k Yellin et al. (1979), ^l Black et al. (1972), ^m Arrang et al. (1987a).

† Data from racemic mixture.

B

Relative potencies of histamine receptor agonists*

Agonist	H ₁	H ₂	H ₃
Histamine	100	100	100
N α -Methylhistamine	72	74	270
N α ,N α -Dimethylhistamine	44	51	170
2-Methylhistamine	16.5	4.4	<0.08
2-Thiazolylethylamine	26	2.2	<0.01
4-Methylhistamine	0.23	43	<0.008
Dimaprit	<0.0001	71	<0.008
Impromidine	<0.001	4810	Antagonist
R-(α)-Methylhistamine	0.5	1.0	1550
S-(α)-Methylhistamine	0.5	1.7	13

* H₁ and H₂ data from Ganellin (1982); H₃ data from Arrang et al. (1983, 1987a, 1985c).

Tabla 1. Potencias de distintos antagonistas histaminérgicos (A), y potencias relativas de distintos agonistas histaminérgicos (B). (Tomado de Hill, S.J. 1990. Distribution, properties and functional characteristics of three classes of histamine receptor. Pharmacol. Rev. 42, 45-83).

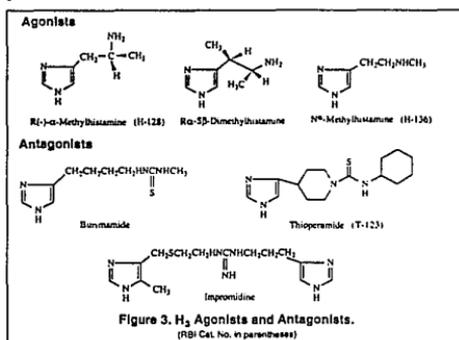
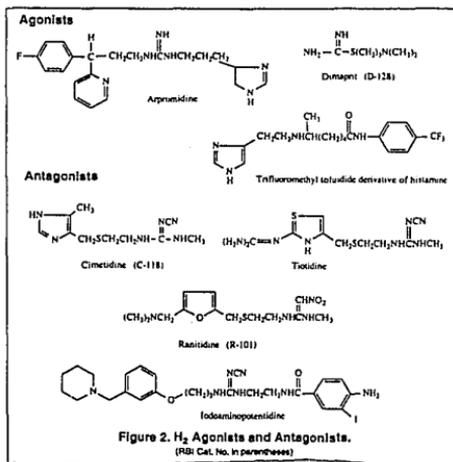
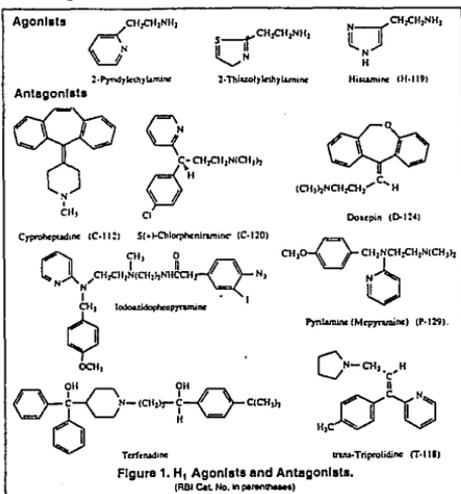


Fig.5. Estructuras de diversos agonistas y antagonistas H₁, H₂ y H₃. (Tomado de Hill, S.J. 1992. Histamine Receptor Agonists and Antagonists. Neurotransmissions VIII, número 1, pp. 1-8. Publicado por Research Biochemicals Inc. Natick, Mass. USA)

Sin embargo, casi todos los agonistas histaminérgicos tienen, además de un efecto principal sobre un tipo de receptor, otros posibles efectos sobre los otros receptores de HA (aunque éstos sean relativamente pequeños). Por lo tanto, la discriminación entre receptores por un fármaco es más bien cuantitativa y no cualitativa (Prell y Green 1986). Para una revisión de los fármacos existentes, así como de sus características químicas y potencias, K_d 's, etc., el lector es referido a excelentes revisiones por Hill (1990, 1992), Haaksma et al. (1990), Parsons (1991) y Timmerman (1989).

En cuanto a los mecanismos de comunicación intracelular mediante los cuales la HA ejerce sus efectos en sus células blanco, múltiples observaciones hechas en distintos tejidos y células han sugerido que los receptores H1 están acoplados positivamente a la hidrólisis de fosfoinosítidos, y que los receptores H2 están acoplados positivamente a la adenilato ciclasa. Aún se desconoce cuál es la vía de comunicación intracelular empleada por los receptores H3 (ver Hill, 1990; Mitsuhashi y Payan, 1992; y Timmerman, 1989).

La estimulación de receptores H1 en distintas líneas celulares, tales como astrocitomas humanos, astrocitos primarios de rata, NG108-15 y N1E-115, también produce un aumento en los niveles de IPx y un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (ver Fisher et al., 1992). El cerebro no es ninguna excepción en cuanto a la producción de IPx en respuesta a la estimulación de receptores H1. Daum et al. (1984) demostraron la acumulación de 3H inositol-1-fosfato, en presencia de Li^+ , en rebanadas de distintas regiones del cerebro del cual en respuesta a la aplicación de HA al medio de incubación.

El Li^+ se emplea en muchos estudios en los que se desea medir la producción de IPx, ya que este elemento es un inhibidor no competitivo de la inositol monofosfatasa. Esta enzima remueve el grupo fosfato del inositol monofosfato, para convertirlo en inositol. De esta manera, la enzima contribuye a regenerar las pozas de inositol libre. El inositol monofosfato es, a su vez, un producto de la degradación del $Ins1,4,5P_3$ (y de otros IPx más fosforilados que el IP1).

Normalmente el metabolismo de los IPx es tan rápido que, si no se usara este inhibidor, difícilmente se podría detectar su producción. Mediante el empleo del Li^+ , se logra provocar una acumulación medible de IP1, que a su vez es un indicador indirecto de la tasa de producción de $Ins1,4,5P_3$.

La producción de IPx en respuesta a HA en distintas líneas neuronales (Fisher et al., 1992), así como la observación de Daum et al. (1984), son relevantes para el presente trabajo. Esto se debe a que el modelo experimental empleado en este estudio es de naturaleza neural, y a que la técnica empleada para medir la acumulación de IPx es similar a la empleada por nosotros.

El gen del receptor H1 ha sido ya clonado y secuenciado en el bovino (Yamashita et al., 1991) y en la rata (Fujimoto et al., 1993; también ver Timmerman, 1992). El grado de homología entre los genes de las dos especies es de 73% en total, y de 94% en las supuestas regiones transmembranales. El gen del receptor H1 de rata ha sido también expresado exitosamente en un sistema de transfección (Fujimoto et al. 1993).

El gen del receptor H1 carece de intrones y en la rata codifica a una proteína de aproximadamente 486 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 55690 Da. El análisis de la secuencia de aminoácidos sugiere que esta proteína tiene 7 dominios transmembranales, lo que es característico de receptores acoplados a proteínas G. Este gen presenta también sitios conservados que se encuentran en otros genes de receptores de aminas biogénicas. Por medio de estudios de expresión se pudo observar la presencia del transcrito de este gen en el cerebro de rata.

El gen del receptor H2 también ha sido ya clonado y secuenciado en el perro (Gantz et al., 1991) y en la rata (Ruat et al., 1991; ver también Birdsall, 1991). El grado de homología observado entre estas dos especies es de 82% en total, y de 92% en las regiones transmembranales. El gen del receptor H2 de rata ha sido expresado en células CHO, en las que produce una acumulación de cAMP (Traiffort et al., 1992a).

El gen del receptor H2 se expresa en varios tejidos de rata, como el estómago y el cerebro (Ruat et al., 1991). Este gen también está desprovisto de intrones, y en la rata codifica a una proteína de 358 aminoácidos. El análisis de la secuencia indica la presencia de 7 dominios transmembranales, lo que sugiere que este receptor también pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G.

Hasta la fecha, no existen estudios en los que se haya clonado y secuenciado el gen del receptor H3; sin embargo, estudios de solubilización de proteínas membranales han indicado que el receptor H3 tiene un peso molecular de 220 kDa, y que puede estar acoplado a alguna proteína G (Zweig et al., 1992).

++)Neurobiología de la HA.

Mediante métodos inmunocitoquímicos, ha sido posible determinar la presencia de HA y de histidina descarboxilasa en el SNC (ver Prell y Green, 1986). Éstas dos se encuentran en neuronas y en células cebadas (ver Timmerman, 1989).

Los cuerpos celulares de las neuronas histaminérgicas se encuentran localizados en el núcleo tuberomamilar de la parte ventral del hipotálamo posterior. Estas neuronas se hallan agrupadas en 5 pequeños núcleos, llamados E1-E5. Los grupos emiten sus proyecciones en una manera similar, por lo que se considera que todas las neuronas histaminérgicas constituyen un solo grupo funcional.

Las proyecciones, de naturaleza varicosa, llegan a casi todas las partes del cerebro, donde se encuentran presentes de manera difusa y al parecer aleatoria. Muy pocas de ellas establecen contactos sinápticos (ver Wada et al., 1991; Russell et al., 1990). Esto sugiere que sus secreciones se difunden en el cerebro, donde pueden afectar las actividades de varias neuronas y de otros tipos celulares (ver Hill, 1992; Russell et al., 1990).

Un número de observaciones (Russell et al., 1990; ver Prell y Green 1986; Hill, 1992; y Donoso y Alvarez, 1984; Mochizuki et al., 1992) parecen confirmar que la HA funciona como un neurotransmisor ó un neuromodulador en el SNC:

1-Es posible encontrar HA en el espacio extracelular de algunas regiones del cerebro, como el hipotálamo y el cuerpo estriado.

2-La concentración hallada de HA (aprox. 10 nM) está dentro del intervalo en el que se encuentran las concentraciones de otros neurotransmisores, como las catecolaminas.

3-La HA está presente principalmente en axones y cuerpos celulares.

4-Al fraccionar al tejido, la HA se halla principalmente en la fracción sinaptosomal.

5-La tasa de síntesis de HA aumenta al elevarse los niveles de L-histidina (la abundancia de L-histidina es la limitante de la reacción que convierte a ésta en HA).

6-En el SNC es posible detectar a la histidina descarboxilasa.

7-Es posible observar un aumento en los niveles de HA en líquido extracelular posteriormente a la despolarización de la preparación estudiada con alto K^+ (las células cebadas no secretan HA en respuesta a alto K^+). Este aumento es sensible a tetrodotoxina y depende de Ca^{2+} extracelular.

Se ha observado un patrón circadiano de secreción de HA en el hipotálamo de la rata. Los niveles aumentan durante la noche, que es el período activo de estos animales (Mochizuki et al., 1992; Philippu y Prast, 1991). En estos animales, también se observan ciclos ultradianos de secreción, con una frecuencia de 1 ciclo/ 1.5 horas. Estos ciclos parecen componerse de oscilaciones de menor período, mismas que tienen una frecuencia aprox. de 1 ciclo/10-20 min (Philippu y Prast, 1991).

La HA parece estar involucrada en la regulación de las funciones endócrinas, ejercida por el hipotálamo. Además, parece jugar un importante papel en un número de funciones en el SNC, tales como: nocicepción, regulación del estado de alerta, metabolismo energético, analgesia, función vestibular, aumento de la presión arterial, aumento de los niveles de glucosa, y disminución de la temperatura corporal, entre otros (ver Wada et al., 1991; y Knigge y Warberg, 1991).

La HA también parece estar involucrada en la modulación de algunas conductas, tales como la actividad locomotora y las conductas sexual, alimentaria y de ingesta de agua. La conducta exploratoria parece tener un importante componente histaminérgico (Alvarez y Banzán, 1992; ver Wada et al., 1991; y Knigge y Warberg, 1991).

Dentro del SNC, la HA probablemente también está involucrada en procesos que no son propiamente neurales, tales como la inflamación ó la modulación de la presión arterial.

++)Participación de la HA en el control de mecanismos neuroendócrinos.

Se ha postulado que la HA tiene una función reguladora en varios mecanismos neuroendócrinos (ver Donoso y Alvarez, 1984; Weiner et al., 1988; y Knigge y Warberg, 1991). Muy probablemente las acciones de la HA se ejercen al nivel del hipotálamo. En esta zona existe una densidad alta de fibras histaminérgicas, que muchas veces están cerca de donde se sintetizan las hormonas hipofisiotrópicas (ver Knigge y Warberg, 1991).

Los niveles más altos de HA se observan en la eminencia media, aunque también hay gran abundancia en los núcleos arcuato, supraquiasmático y tuberomamilar. La desaferenciación del hipotálamo mediobasal no disminuye los niveles de HA en la eminencia media (ver Weiner et al., 1988).

Por otro lado, se ha observado, principalmente mediante estudios de cinética de unión, que en el hipotálamo de la rata los receptores H1 son relativamente abundantes y que, contrastantemente, el número de receptores H2 y H3 es comparativamente escaso. La distribución de receptores H1 marcados con radioligandos específicos se correlaciona en buena manera con la distribución de fibras histaminérgicas (Traiffort et al., 1992b, Pollard et al., 1993; ver Knigge y Warberg, 1991). Lo anterior sugiere que la mayoría de las acciones hipotalámicas de la HA son mediadas por receptores H1.

A este respecto, Jorgenson et al. (1989) encontraron que la aplicación de HA a rebanadas de hipotálamo, incluido en ellas el núcleo arcuato, tiene el efecto de provocar en neuronas de dicho núcleo respuestas electrofisiológicas excitadoras, y que este efecto estuvo mediado por receptores H1.

Desde 1914 se sabe que la HA, inyectada intra-arterialmente cerca de la glándula adrenal del perro, tiene el efecto de estimular la secreción de E. Esta estimulación es sensible a la presencia de antihistamínicos. De hecho, la HA tiene el mismo efecto en tejido adrenal cromaffín aislado (ver Donoso y Alvarez, 1984). Esto fue el primer indicio de que la HA puede participar en la regulación de la secreción de algunas hormonas.

Otras observaciones han sugerido que la HA inyectada icv, aún en concentraciones que no producen respuestas periféricas, tiene el efecto de incrementar la secreción de la corteza adrenal.

Aparentemente, la HA tiene acciones sobre mecanismos hipotalámicos que controlan la secreción de ACTH vía la secreción de CRH. La HA también estimula la secreción (aparentemente mediada por CRH) de péptidos derivados de la POMC en el lóbulo anterior de la hipófisis, tales como la beta-END y la alfa-MSH (ver Donoso y Alvarez, 1984; y Knigge y Warberg, 1991).

La microinyección de HA en el núcleo supraóptico parece tener la consecuencia de elevar la tasa de secreción de vasopresina. La HA ha sido también implicada en el control de la oxitocina (ver Donoso y Alvarez, 1984; y Kingge y Warberg, 1991).

La HA parece estar involucrada en la regulación de la secreción de PRL: la aplicación ó microinyección de HA en el área anterior/preóptica de la rata induce un pico de secreción de PRL.

La HA probablemente participe indirectamente en la secreción de GH, y en la secreción de TSH (ver Knigge y Warberg, 1991).

La secreción de LH también parece estar regulada por la HA. En 1955, Sawyer demostró que la administración icv, pero no intravenosa, de HA a conejos tratados con estrógenos, induce la ovulación (ver Weiner et al., 1988).

La administración icv de este compuesto a ratas en proestro y a ratas ovariectomizadas y tratadas con estrógenos produce una elevación en los niveles de LH; sin embargo, este efecto no pudo ser observado al emplear ratas macho ó hembras en diestro ó estro (ver Donoso y Alvarez, 1984; Weiner et al., 1988). Esto sugiere que los niveles de esteroides gonadales determinan el tipo de respuesta.

Los estudios existentes relacionados con tipo de receptor (H1 u H2) que se encuentra involucrado en la regulación de LH por la HA, son conflictivos (ver Donoso y Alvarez, 1984; Weiner et al., 1988). La aplicación de 4-metilhistamina, un agonista H2, tuvo el mismo efecto estimulador que la HA sobre la secreción de LH; esta respuesta no pudo ser observada al administrar agonistas H1 (Donoso y Zárate, 1983; Donoso y Alvarez, 1984). Por otro lado, Horno y Alvarez (1989) observaron que sólo la aplicación conjunta de antagonistas H1 y H2 pudo bloquear el pico de LH inducido por estrógenos en la rata. Más aún, en estos animales, la aplicación de alfa-fluorometilhistamina (un inhibidor de la síntesis de HA) también bloqueó el pico de secreción de LH inducido por estrógenos (Ibid.). En un elegante estudio realizado *in vitro*, Miyake et al. (1987) demostraron que la HA estimula la secreción de LH por la hipófisis, y de GnRH por el hipotálamo mediobasal, aparentemente por medio de receptores H1. Los resultados de Miyake et al. (1987) también sugieren que la HA podría mediar los efectos estimuladores de los estrógenos sobre la secreción de GnRH, y que la HA no tiene acciones directas sobre la hipófisis en cuanto a la secreción de LH.

Otros autores (Van Kirk et al. 1989) indican que la HA controla la secreción de LH en ovejas hembras también por medio de receptores H1.

Ohtsuka et al. (1989) demostraron, en hipotálamos mediobasales de rata *in vitro*, un aumento en los niveles de HA, NE, y DA, así como un incremento en la secreción de GnRH, en respuesta a la adición de estradiol. La HA en estos estudios no produjo un aumento en la secreción de NE (cf. Blandina et al., 1989 y Bealer, 1993; ver más abajo), ni la NE provocó incrementos en la secreción de HA. Esos tres neurotransmisores pueden estimular a su vez la secreción de GnRH, como discutimos anteriormente.

Por otro lado, Charli et al. (1978) reportaron que la HA no tuvo ningún efecto sobre la secreción de GnRH por el hipotálamo mediobasal de rata macho *in vitro*.

Es posible que la diferencia existente entre los hallazgos de Miyake et al. (1987) y de Charli et al. (1978) se deba a la abundancia diferencial de los distintos esteroides gonadales en el hipotálamo de esa especie. Esto indicaría que la regulación histaminérgica de la secreción de GnRH puede ser distinta en ambos sexos (ver también Weiner et al., 1988; Donoso y Alvarez, 1984).

Todo lo disuido anteriormente sugiere que las neuronas histaminérgicas se encuentran involucradas, a nivel del hipotálamo, en la secreción de GnRH y en la mediación de la generación del pico de LH. Probablemente las neuronas histaminérgicas también medien algunos de los efectos de los estrógenos sobre la secreción de GnRH, como lo indican los resultados de Ohtsuka et al. (1989). Aquí hacemos un resumen de todos los hechos que apoyan esta noción:

1-El bloqueo de los receptores H1 (Miyake et al. 1987; Van Kirk et al. 1989), H2 (Donoso y Alvarez, 1984), ó de ambos, así como la inhibición de la síntesis de HA (Horno y Alvarez 1989), inhiben la secreción de LH.

2-Las zonas en las que están presentes las neuronas GnRHérgicas están densamente innervadas por fibras histaminérgicas (ver Knigge y Warberg, 1991).

3-En las zonas del hipotálamo donde se encuentran las neuronas GnRHérgicas existe una relativa abundancia de receptores H1 (Traiffort et al., 1992b, Pollard et al., 1993; ver Knigge y Warberg, 1991).

4-In vitro, la HA estimula la secreción de GnRH por el hipotálamo mediobasal en las hembras (Miyake et al. 1987; ver también Wada, 1991), pero aparentemente no en los machos (cf. Charli et al. 1978).

5-La hipófisis no responde a la HA para liberar LH; la HA estimula la secreción en fragmentos hipofisiarios en incubación sólo en la presencia de tejido hipotalámico (Miyake et al., 1987).

6-La pirilamina (antagonista H1) bloquea la estimulación de la secreción de GnRH provocada por estradiol en el hipotálamo mediobasal in vitro (Ibid.).

En cuanto a la regulación de las neuronas histaminérgicas por otros sistemas, se ha observado que éstas reciben impulsos aferentes de fibras provenientes de la corteza prefrontal, del área preóptica medial y del septum. También reciben aferencias de fibras que contienen neuropéptido Y, substancia P, NE, 5-HT, y E (Wada et al. 1991).

La adenosina y el GABA modulan la producción de IPx inducida por HA en rebanadas corticales; la secreción de HA por rebanadas hipotalámicas es suprimida por GABA (ibid.).

In vivo, la adición de L-Glu en el hipotálamo de rata tiene el efecto de estimular la secreción de HA. Esta acción parece estar mediada por receptores tipo NMDA (Okakura et al., 1992). También in vivo, la HA estimula aparentemente la secreción de NE en el área anterior/paraventricular del hipotálamo, vía receptores H1 (Bealer, 1993). Al parecer existe una interacción funcional entre los sistemas adrenérgicos e histaminérgicos centrales.

La observación de Bealer (1993) contrasta con lo reportado por Ohtsuka et al. (1989), quienes no observaron incrementos en los niveles de NE en respuesta a HA en rebanadas de hipotálamo in vitro. El trabajo de Bealer también difiere de lo reportado por Blandina et al. (1989), quienes reportan un incremento en la secreción de NE en respuesta a la aplicación de agonistas H2 a hipotálamos de rata in vivo.

En conclusión, la HA participa de manera importante en la regulación de la secreción de algunas hormonas hipotalámicas, entre ellas de GnRH.

Al parecer, existe en el hipotálamo una intrincada red de interacciones entre diferentes sistemas neuronales que regulan la secreción de distintos compuestos, que a su vez controlan la secreción de GnRH. Descifrar la estructura, el orden y el funcionamiento de esa red es quizá el reto más grande de la neuroendocrinología de la reproducción.

2.4-Las líneas neuronales GT1.

-Origen y desarrollo.

La técnica de tumorigénesis genéticamente dirigida consiste en la inducción de un tumor de un tipo celular determinado en algún organismo. Esto se puede lograr de diversas maneras, como por ejemplo en ratones transgénicos, mediante una serie de pasos. El primero consiste en la construcción de una secuencia de DNA que comprende a un oncogén ligado a una secuencia de DNA que normalmente sólo es funcional en el tipo celular a transformar (e.g., la región reguladora de un gen tejido-específico). De esta manera, la expresión del oncogén está ligada a la expresión del gen elegido, y restringida por la activación de la secuencia reguladora escogida. Esta construcción es después introducida en ovocitos fecundados en su fase de una sola célula. Posteriormente, los ovocitos son reimplantados en madres pseudoembarazadas. Los productos se examinan al nacer para determinar en cuáles de ellos sí existe la expresión del transgén. Al cabo de un tiempo, en algunos individuos transgénicos probablemente se desarrollará un tumor. De ser el caso, este último es extirpado y sus células dispersadas. A partir de algunas de éstas se pueden establecer líneas celulares inmortalizadas, ya que esas células expresan el oncogén de manera constitutiva.

En 1990, el grupo de Mellon et al. (1990) desarrolló, mediante el empleo de este enfoque en ratones, tres líneas neuronales hipotalámicas secretoras de GnRH. Básicamente, se construyó un gen híbrido que contiene al promotor del gen de GnRH (-2987 a -1172 y -441 a +104 pares de bases) en la región 5', ligado al potente oncogén antígeno T perteneciente al virus de simio 40 (SV40).

Como resultado de la microinyección de este gen a un número de ovocitos fecundados, se obtuvieron 9 ratones transgénicos, todos ellos estériles. De éstos, dos desarrollaron tumores hipotalámicos, y en uno de éstos dos (llamado GT-1) fue posible identificar un tumor grande en la región que se extiende desde el quiasma óptico hasta la cápsula interna.

Por medio de estudios de expresión se demostró la existencia, en las células transformadas, de altos niveles de mRNA de GnRH y de antígeno T. La presencia de estos mRNAs fue específica del tumor comparativamente con otros tejidos.

El tumor se extirpó, y se dispersaron sus células componentes. Éstas eran de naturaleza heterogénea, tenían fenotipos tanto neuronal como glial, y proliferaban en cultivo.

Estas células se subcultivaron durante 6 meses, con el fin de separar a las células gliales de las neuronales gracias a las diferentes propiedades de adherencia al sustrato de uno y otro tipo. Después de este tiempo, se pudo establecer un cultivo de células homogéneas, al que se llamó GT1. A partir de este cultivo se hicieron diluciones seriadas, con lo que se logró establecer tres líneas clonales, llamadas GT1-1, GT1-3, y GT1-7.

Estas tres líneas exhiben un fenotipo neuronal, tanto morfológica como bioquímicamente. Las líneas presentan marcadores neuronales, como la enolasa neuroespecífica y la proteína de neurofilamentos de 68 kDa. Además, expresan mRNAs de proteínas específicas de membrana sináptica, como la VAMP 2 y la proteína SNAP 25 kDa. Esta última está asociada con membranas presinápticas y es específica de neuronas. Por otro lado, en estas células no es posible detectar marcadores gliales, tales como la proteína ácida fibrilar glial, ó la proteína básica de mielina. Además, expresan el mRNA de la GnRH, pero no los de somatostatina, POMC, CRH, ni GHRH. Las líneas GT1 han sido caracterizadas también por inmunocitoquímica, microscopía de luz, y microscopía electrónica (Lipovits et al., 1991).

Estas células son susceptibles de sufrir cambios morfológicos importantes al ser estimuladas con fármacos que interfieren con las vías de comunicación intracelular. Por ejemplo, la forskolina, que estimula a la adenilato ciclasa, tiene el efecto de inducir la producción y el elongamiento de neuritas, así como de darles a las neuronas una apariencia aplanada. Por el contrario, el TPA, que es un estimulador de la PKC, parece tener el efecto de hacer que disminuyan el tamaño y el número de neuritas, así como de darles a las células una apariencia redonda (Wetsel et al., 1993). Lo anterior sugiere que, en estas células, las vías de comunicación intracelular están involucradas, al menos parcialmente, en la regulación de procesos morfogénicos.

Estas células secretan GnRH en respuesta a una despolarización de la membrana, como es característico de las neuronas neuroendócrinas. La aplicación de veratridina, que provoca la apertura de los canales rápidos de Na^+ , estimula la secreción, mientras que la incubación de estas neuronas con tetrodotoxina, un bloqueador de los canales de Na^+ , inhibe la secreción. También es posible observar un aumento en la secreción

al incubarlas en presencia de una concentración alta de K^+ . Este aumento no es bloqueado por la aplicación simultánea de tetrodotoxina (Mellon et al., 1990; Martínez de la Escalera et al., 1993; Krsmanovic et al., 1992).

Finalmente, la inyección intrahipotalámica de células GT1 a ratones mutantes que presentan hipogonadismo (por carecer de un gen funcional de GnRH), puede revertir este defecto. Las células GT1 adquieren en el hipotálamo un fenotipo claramente neuronal que incluye la formación de axones y dendritas (Silverman et al., 1992).

-Utilidad e importancia.

En comparación con la dificultad para estudiar la biología de las neuronas GnRHérgicas in vivo ó in vitro, planteada por el escaso número y distribución difusa de éstas, las líneas GT1 permiten abordar con mayor facilidad el estudio de una serie de aspectos acerca de la biología de dichas neuronas. Entre éstos están su bioquímica, su electrofisiología, la regulación que se ejerce sobre la síntesis y secreción de sus productos, su biología molecular, su biología celular (procesos como diferenciación, migración, formación de procesos celulares, etc. e.g. Silverman et al., 1992), etc. No obstante lo anterior, los resultados obtenidos con las células GT1 deben ser tomados con cierta cautela, debido a que éstas son células transformadas obtenidas a partir de un tumor. Por esa razón, estas células quizá no reflejen en su totalidad la naturaleza del tipo celular del que fueron derivadas. Los estudios realizados con las líneas GT1 deberían ser complementados, idealmente, con estudios en hipotálamos in vitro, y con estudios in vivo.

En conclusión, las líneas GT1 representan un modelo experimental muy útil en el estudio de la neuroendocrinología de la reproducción y de la comunicación neuroendócrina.

III-Planteamiento del problema.

Estudios previos sugieren que la secreción de GnRH es estimulada por la HA. Este efecto parece estar mediado por receptores H1 (Miyake et al., 1989; Ohtsuka et al., 1989; Van Kirk et al., 1989; ver Weiner et al., 1988), H2 (Donoso y Zárate, 1983; ver Donoso y Alvarez, 1984), ó por ambos (Horno y Alvarez, 1989; ver Knigge y Warberg, 1991).

En los estudios mencionados, no fue posible determinar si la modulación de la secreción de GnRH (o de LH como un indicador indirecto) observada es debida a un efecto directo de la HA sobre las neuronas GnRHérgicas, ó si la modulación está mediada por interneuronas.

Más aún, en caso de existir un efecto directo de la HA sobre las neuronas GnRHérgicas, las vías de comunicación intracelular involucradas se desconocen. Lo anterior, y la controversia con respecto a la identidad del tipo ó tipos de receptores histaminérgicos involucrados en la respuesta, probablemente se deban a la dificultad para estudiar estas cuestiones relacionada con el reducido número y distribución difusa de las neuronas GnRHérgicas en el hipotálamo.

Por otro lado, numerosos estudios indican que tanto en el SNC como en otros sistemas, el receptor H1 está acoplado positivamente a la hidrólisis de fosfoinosítidos, y que el receptor H2 está acoplado positivamente a la adenilato ciclasa (ver Fisher, 1992; y Hill, 1990).

Observaciones inéditas del laboratorio indican que la HA estimula, en forma directa, la secreción de GnRH por la línea celular GT1-1. Este efecto es dependiente de la concentración de HA (fig.6) y del tiempo de periferfusión (fig.7). La respuesta puede ser bloqueada por pirilamina (antagonista H1), mas no por ranitidina ni por tioperamida (antagonistas H2 y H3, respectivamente) (fig.8).

Por otro lado, no se puede observar ningún incremento en los niveles de cAMP en respuesta a la aplicación de HA en distintas concentraciones y por diferentes tiempos (fig.9).

Los resultados inéditos del laboratorio obtenidos con los distintos antagonistas sugieren que, en las células GT1-1, la secreción de GnRH en respuesta a HA pudiera estar mediada por receptores H1. Esta noción es apoyada por la inexistencia de alguna respuesta a HA en los niveles de cAMP (generalmente los receptores H2 están acoplados positivamente a la adenilato ciclasa; ver Hill, 1990; 1992).

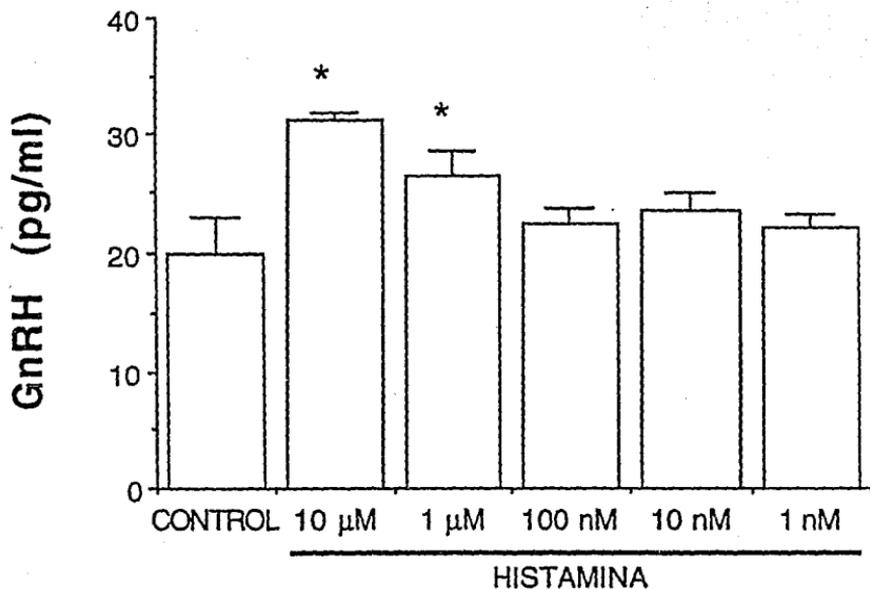


Fig.6. Secreción de GnRH por la línea neuronal GT1-1 en respuesta a distintas concentraciones de HA, medida por radioinmunoensayo (RIA) (resultados inéditos del laboratorio).

*, $P < 0.05$ vs control .

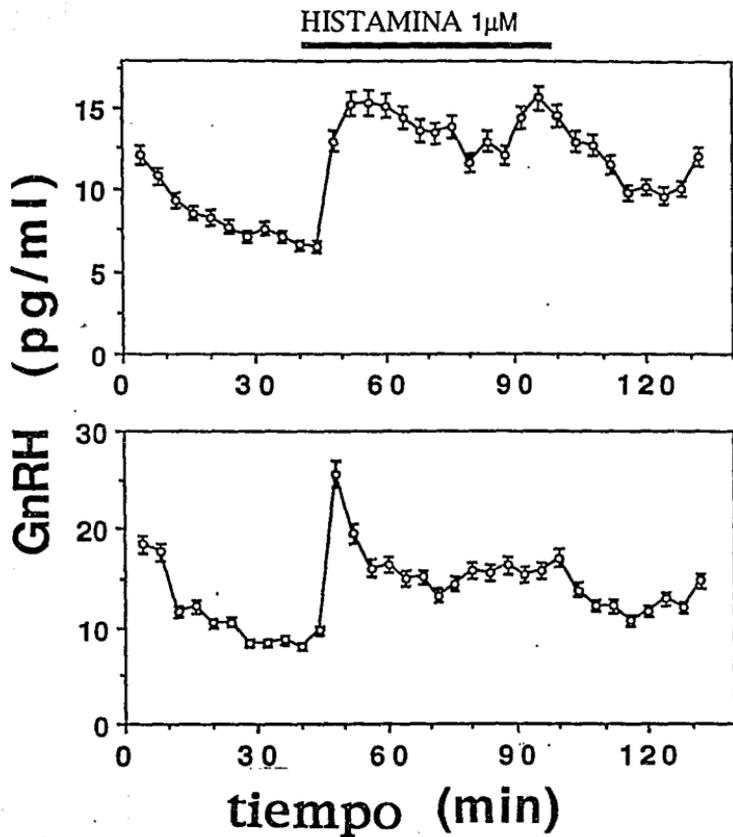


Fig.7. Curso temporal de la secreción de GnRH por la línea neuronal GT1-1, medida por RIA, en respuesta a HA 1 μ M. Los resultados mostrados corresponden a 2 experimentos de periferfusión independientes (resultados inéditos del laboratorio).

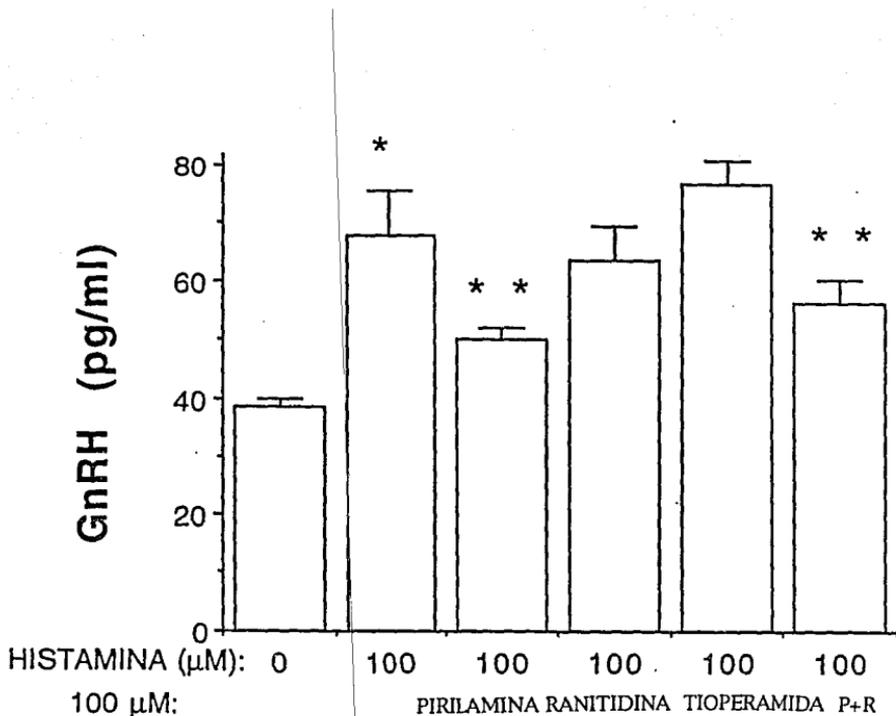
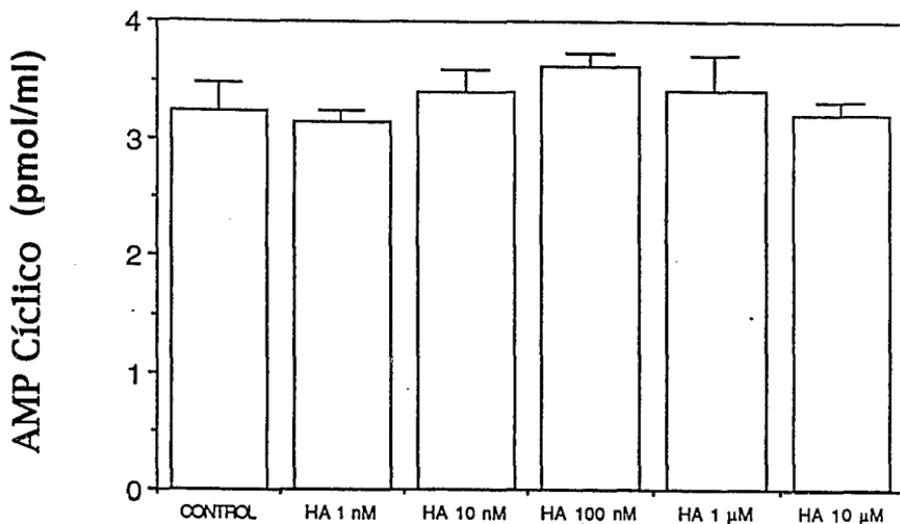


Fig.8. Secreción de GnRH por células GT1-1 en respuesta a la aplicación de HA 100 μ M, y en respuesta a la aplicación simultánea de HA 100 μ M y pirilamina (antagonista H1) 100 μ M; de HA 100 μ M y ranitidina (antagonista H2) 100 μ M; de HA 100 μ M y tioperamida (antagonista H3) 100 μ M; y de HA 100 μ M y pirilamina + ranitidina (P+R), ambas 100 μ M. *, P < 0.05 vs control; **, P < 0.05 vs HA 100 μ M. (resultados inéditos del laboratorio).

A



B

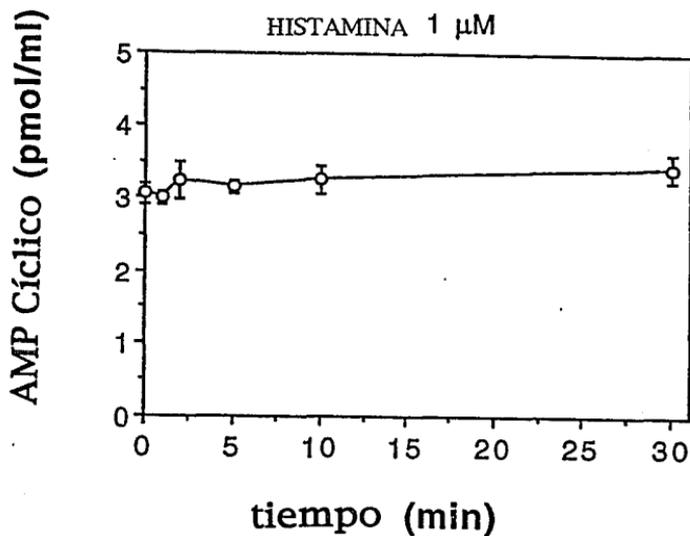


Fig.9. Producción de cAMP (medido por RIA) en respuesta a distintas concentraciones de HA (A), y a distintos tiempos de aplicación de HA 1 μ M (B) en las células GT1-1 (resultados inéditos del laboratorio).

En el presente trabajo se probó la hipótesis de que la HA es capaz de estimular la producción de IPx en la línea neuronal GT1-1, y de que este efecto está mediado por receptores H1 acoplados positivamente a la PLC.

IV- Material y métodos.

- Cultivo celular.

Las células GT1-1 fueron generosamente donadas por el Dr. Richard Weiner (Universidad de California, San Francisco). Estas células, congeladas en N₂ líquido en el pasaje 7, fueron descongeladas al ponerlas directamente en un baño a 37 °C. Posteriormente, fueron sembradas en frascos de cultivo de 75 cm² (Costar, Cambridge, MA, USA).

El medio de cultivo celular que se empleó en estos estudios fue el DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO BRL-Life Technologies, Grand Island, NY, USA), adicionado con suero fetal bovino (*fetal calf serum*, FCS, GIBCO) al 10% y 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (P-S, GIBCO). Las células se crecieron en un incubador a 37 °C, con 5% de CO₂ y alta humedad. El medio de cultivo se cambió cada 3 días.

Cuando las células llegaban a confluencia, era necesario subcultivarlas. Para subcultivar, primero se aspira el medio de incubación y se reemplaza éste con 10 ml de una disolución salina balanceada (HBSS - *Hanks' Balanced Salt Solution*) que contiene tripsina al 0.05% y EDTA•4Na 0.53 mM (GIBCO).

Después de aproximadamente 3 minutos, las células se despegan de la superficie del frasco. Entonces, esta nueva suspensión se aspira del frasco y se añade a un tubo de centrífuga de 50 ml (Costar) previamente llenado con 20 ml de medio de cultivo; el suero detiene la acción de la tripsina.

Posteriormente, esta nueva suspensión se centrifuga a 1000 rpm en una centrífuga clínica durante 8 minutos, al cabo de los cuales se aspira el sobrenadante y se resuspende el botón con 50 ml de medio de cultivo. Esta suspensión tiene que tener una distribución homogénea de células: las células se dispersan con una pipeta (cargándola y descargándola con la suspensión suficientes veces).

A continuación se procede a sembrar una alícuota de esta suspensión (generalmente 10 ml) en otro frasco de cultivo (el cultivo acarreador ó *stock*). El volumen restante se siembra en cajas de 6 pozos de 35 mm de diámetro (*6-well clusters*, 35 mm dia., Costar) cada una, mismas que son utilizadas en los experimentos.

En cada pozo, las células se incubaron con 3 ml de DMEM+FCS+P-S; este medio fue cambiado también cada 3 días. Cuando las células llegaban al 50-60% de confluencia, estaban listas para comenzar con las manipulaciones pertinentes a los experimentos de medición de IPx.

-Preparación de cultivos primarios de adenohipófisis.

Con el fin de asegurarnos de que el método para medir IPx usado en este estudio funcionara correctamente, se determinó la producción de IPx en respuesta a TRH 1 uM aplicado por 15 min a células adenohipofisiarias de rata en cultivo. Es bien sabido que el TRH provoca un incremento en los niveles de IPx en algunas de estas células (ver por ejemplo Fisher, 1992).

A continuación se mencionan los pasos para obtener un cultivo primario de adenohipófisis:

- 1-Pesar 5 mg de colagenasa y ponerla en un frasco de centelleo de 20 ml.
- 2-Calentar hasta 37 °C el DMEM+FCS+P-S y medio de Hanks que se utilizarán en el experimento.
- 3-Decapitar a los animales y quitarles la tapa del cráneo.
- 4-Remover las hipófisis; quitar las neurohipófisis. Las adenohipófisis se colocan en una caja de Petri de 10 cm de diámetro previamente llenada con medio Hanks a 37 °C.
- 5-Lavar las adenohipófisis 2 veces con Hanks para remover el exceso de sangre.
- 6-Seccionar las adenohipófisis con una navaja en pedazos pequeños.
- 7-Colectar los fragmentos en 10 ml de Hanks y transferir a un tubo cónico de 15 ml.
- 8-Centrifugar 2 min a 1000 rpm en la centrífuga clínica.
- 9-Aspirar el sobrenadante.
- 10-Agregar la colagenasa (5 mg de colagenasa en 3 ml de Hanks) y una alícuota de 200 ul de DNAsa.
- 11-Incubar a 37 °C por 60 min en un baño con agitación. El tubo debe estar tapado con papel aluminio.
- 12-Al cabo de la incubación, agregar otra alícuota de DNAsa y dispersar a las células con una pipeta pasteur siliconizada y estéril.
- 13-Centrifugar 10 min a 1000 rpm en la centrífuga clínica.
- 14-Aspirar el sobrenadante. Agregar 5-10 ml de DMEM. Esta suspensión es llevada a homogeneidad con una pipeta pasteur siliconizada y estéril.
- 15-Centrifugar otra vez 10 min a 1000 rpm en la centrífuga clínica.
- 16-Aspirar el sobrenadante y reconstituir el botón con 5 ml de DMEM. Homogenizar la suspensión en la misma manera que en el punto 14.
- 17-Añadir DMEM para tener un volumen suficiente con el cual hacer alícuotas para sembrar.

18-Cada alcuota se siembra en un pozo de 35 mm de diámetro; se emplean también cajas con 6 pozos cada una (Costar). La superficie de los pozos debe ser tratada previamente con matrigel, y las cajas deben estar a 37 °C al momento de sembrar.

19-Poner las cajas en el incubador a 37 °C con CO₂ al 5% y humedad absoluta.

Después de obtener el cultivo primario, es necesario esperar 24 hr a que se establezca para poder comenzar con las manipulaciones necesarias que conducen a medición de la producción de IPx.

- Medición de IPx por cromatografía de intercambio aniónico.

Con el fin de determinar si la HA, y otras sustancias, estimulan la producción de IPx en la línea neuronal GT1-1, se montó en el laboratorio la técnica de separación de IPx por cromatografía de intercambio aniónico. El protocolo aquí descrito es básicamente el mismo que el descrito por Colson et al. (1992), que es una modificación del desarrollado originalmente por Berridge et al. (1982). El protocolo se describe a continuación:

1- Preparación y marcado de las células.

Al momento de subcultivar, se siembran las células GT1-1 en cajas de 6 pozos de 35 mm de diámetro cada uno. Cuando las células alcanzan aproximadamente un 50-60% de confluencia, se aspira el medio de cultivo de cada pozo y se reemplaza con 1.5 ml de DMEM, que contiene 2 uCi/ml de ³H-mioinositol (mio-2-³H-inositol; Amersham, Little Chalfont, U.K.). En el caso de los experimentos en los que se desea elufr a cada uno de los IPx por separado, es conveniente incubar a las células con 1.5 ml de DMEM que contiene 10 uCi/ml de ³H-mioinositol. Los medios radioactivos deben tener P-S, pero no inositol no radioactivo, ni FCS. La actividad específica del ³H-inositol debe ser de 10-20 Ci-mmol.

Las células se incuban en el incubador por 48 hr a 37 °C, humedad absoluta, y 5% de CO₂ antes de iniciar el experimento. En el caso de los cultivos primarios, 24 hr después de prepararlos se aspira el medio y se reemplaza con 1.5 ml de DMEM con 2 uCi/ml de ³H-mioinositol. Estos cultivos también se incuban por 48 hr a 37 °C.

2-Ensayo.

Los ensayos se hacen cuando las células han alcanzado un 70% de confluencia, en el caso de las GT1-1, ó 36 hr después de haber sido sembradas, en el caso de los cultivos primarios. El experimento se inicia a las 48 hr de haber sido marcadas radioactivamente las células. A continuación se describen los pasos a seguir para medir producción de IPx:

1-Aspirar el medio radioactivo y reemplazarlo con 1 ml de DMEM sin ^3H -inositol, sin P-S, y sin FCS. Las células se incuban en este medio 30-45 min.

2-Aspirar el medio anterior y reemplazar con 900 ul de PBS (*phosphate buffered saline*) + Li^+ + glucosa + BSA (*bovine serum albumin*, albúmina de suero bovino) pH 7.4.*

3-Incubar a las células por 20 min, con los 900 ul de PBS + Li^+ + glucosa + BSA, a 37 °C.

4-Al cabo de este tiempo, se inicia el experimento al añadir a los pozos 100 ul de PBS + Li^+ + glucosa + BSA en los que está diluída la substancia a probar, con una concentración 10X. De esta manera, en el volumen final de 1 ml de PBS la substancia experimental está al 1X.

5-Se incuba a las células, por el tiempo necesario en cada experimento, a 37 °C; esto puede hacerse en un baño de incubación ó en el incubador donde se guardan las células.

6-La reacción se detiene al añadir a cada pozo 200 ul de PCA (*perchloric acid*, ácido perclórico; JT Baker, Xalostoc, México) al 30% enfriado en hielo, de manera que la proporción final de PCA sea 5%.

7-Inmediatamente después de detener la reacción, poner las cajas sobre hielo. Añadir enseguida 200 ul de BSA 20 mg/ml; esto ayuda a tener una mejor precipitación.

8-Raspar a las células con un gendarme de plástico (*rubber policeman*, Costar) y mezclarlas con el sobrenadante.

9-Pasar esta mezcla a tubos de centrifuga eppendorf de 1.5 ml.

10-Centrifugar a 1000 X g durante 4 min en una microfuga. Si se desea medir fosfoinosítidos, es preciso guardar el botón.

11-Transferir el sobrenadante a tubos de ensayo de vidrio de 8 cm de largo y 0.8 mm de diámetro. El sobrenadante es neutralizado al añadirle una gota de indicador universal líquido de pH (Merck, Darmstadt, Alemania) y la cantidad necesaria de una disolución de HEPES 75 mM, KOH 1.5 M para obtener un pH entre 6 y 8. Si el sobrenadante se vuelve muy alcalino, el pH puede reajustarse con PCA. El KOH y el

PCA reaccionan para formar una sal, el perclorato de K^+ . Es necesario neutralizar a las muestras, ya que sólo a pH 6-8 el estado de ionización de los grupos fosfato de los IPx les permite unirse a la resina.

12-Incubar el sobrenadante neutralizado en hielo-agua de 5 a 120 min para favorecer la formación de un precipitado de perclorato de K^+ .

13-Centrifugar los sobrenadantes neutralizados durante 4 min a 2500 rpm en una centrifuga Sorvall (DuPont, USA) a 4 °C.

14-Recuperar el sobrenadante neutralizado, transferirlo a tubos de ensayo de vidrio con capacidad de 10 ml, y diluirlo con 8 ml de una disolución que contiene Hepes 2.5 mM, EDTA 0.5 mM pH 7.4.

*La composición del PBS es $CaCl_2$ 0.44 mM; KCl 2.7 mM; $MgCl_2$ 0.5 mM; $NaCl$ 138 mM; Na_2HPO_4 8.1 mM y KH_2PO_4 1.5 mM; además, $LiCl$ 10mM; glucosa 1mg/ml; y BSA 1mg/ml. El PBS se compró de GIBCO. Justo antes del experimento se pesan el $LiCl$ (Merck), la glucosa, y la BSA (ambas de Sigma, St. Louis, MO, USA), y se añaden al PBS. Esta disolución se agita por 15 min y posteriormente se ajusta el pH a 7.4 con $NaOH$ 1N.

3-Separación por columnas Dowex.

1-Vaciar en las columnas los sobrenadantes neutralizados diluidos. En este paso se eluye el 3H -inositol (que no está cargado)

2-Añadir 2 x 7 ml de formiato de amonio (Sigma) 30 mM para terminar de eluir el inositol radioactivo y para eluir también los glicerofosfoinosítidos.

3-Añadir 2 x 6 ml de formiato de amonio 180 mM para eluir los IP1.

4-Añadir 2 x 6 ml de formiato de amonio 400 mM-ácido fórmico 0.1 M para eluir los IP2.

5-Añadir 2 x 6 ml de formiato de amonio 700 mM-ácido fórmico 0.1 M para eluir los IP3.

6-Añadir 2 x 6 ml de formiato de amonio 1M-ácido fórmico 0.1 M para eluir los IP4.

El ácido fórmico fue comprado a Sigma.

*Nota: Cuando se quieren eluir los IPx en conjunto, después de la elución con formiato de amonio 30 mM se eluye directamente con formiato de amonio 700 mM-ácido fórmico 0.1 M. Con este amortiguador no se eluyen los IP4; sin embargo, éstos últimos representan un muy bajo porcentaje (menos del 1%) del total de los IPx.

Con este método no es posible separar, unos de otros, a los distintos isómeros (e.g., el Ins1,4,5P3 del Ins1,3,4P3) de cada uno de los IPx (IP1, IP2, IP3, etc); todos ellos eluyen en conjunto. Por esta razón, en los resultados de este trabajo se habla de los IP3 y no de Ins1,4,5P3. Sin embargo, este último es el que se forma preferencialmente en respuesta a la estimulación de la PLC.

Los eluados se colectan en frascos de centelleo de 20 ml. De éstos, se toman 8 ml y se agregan a otros frascos de centelleo que contienen 12 ml de líquido de centelleo (RPI, Mount Prospect, IL, USA). Esta mezcla se agita por 1 min en el vórtex; posteriormente, los frascos se limpian por fuera con alcohol al 70% y se ponen a contar en un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

4-Manejo de la resina y de las columnas.

+Preparación de la resina:

1-Poner 125 g de resina Dowex AG1-X8 forma de formiato (BIO-RAD, Richmond, CA, USA) en 500 ml de H₂O bidestilada. Agitar la suspensión, y después esperar a que se sedimente la resina. Aspirar el agua.

2-Lavar la resina 2 ó 3 veces en el mismo volumen de H₂O bidestilada (para eliminar partículas finas).

3-Guardar la resina hidratada a 4 °C.

+Preparación de las columnas.

1-Justo antes del ensayo, poner 1.6 ml de resina en columnas Poly-Prep de 10 ml (BIO-RAD).

2-Equilibrar las columnas con 3 ml de Hepes 2.5 mM EDTA 0.5 mM pH 7.4.

Nota: una vez preequilibradas, las columnas pueden dejarse por varias horas; sin embargo, es mejor preequilibrarlas justo antes de usarlas.

+Regeneración de la resina.

En general, las columnas se reutilizan de dos a tres veces, después de lo cual se observa una reducción de su capacidad de absorción. La resina se regenera al pasar

por la columna 2 x 6 ml de formiato de amonio 3 M-ácido fórmico 0.1 M, y luego 2 x 7 ml de Hepes 2.5 mM, EDTA 0.5 mM pH 7.4. Las columnas con resina se guardan a 4 °C entre experimentos.

-Diseño experimental.

En cada uno de los 5 experimentos realizados para comprobar la producción de IPx en respuesta a TRH en cultivos primarios de adenohipófisis, se sembraron células en una caja con 6 pozos de 35 mm de diámetro. A 3 de éstos se les agregó TRH (Sigma) 1 μ M por 15 min, y a los otros 3 se les agregó PBS como control.

En todos los experimentos con las células GT1-1 (al igual que con las células hipofisiarias), cada determinación se hizo por triplicado. Salvo en los experimentos de respuesta dependiente de la concentración, en los que se eluyeron los 4 distintos IPx por separado, en todos los experimentos se determinó la producción de IPx totales (se utilizó el amortiguador de formiato de amonio 700 mM-ácido fórmico 0.1 M para elufr). El tiempo de incubación empleado en los experimentos de respuesta dependiente de la concentración tanto de HA como de 2-TEA, fue de 10 min; las concentraciones empleadas en estos experimentos fueron de -8 a -4 logM en el caso de la HA, y de -9 a -3 logM en el caso de la 2-TEA.

En los cursos temporales con HA, dimaprit y alfa-MH, los tiempos fueron distintos y están comprendidos en el intervalo de 0 a 30 min; la concentración de los tres compuestos fue de 100 μ M.

En los experimentos con los antagonistas y con pirlamina sola, el tiempo de incubación empleado fue de 30 min. En los primeros, se probaron distintas concentraciones (-9 a -4 logM) de los antagonistas; éstos fueron aplicados simultáneamente con HA 100 μ M. En estos experimentos se hizo un control interno con HA 100 μ M en ausencia de antagonistas. Las concentraciones empleadas con pirlamina en ausencia de HA fueron de -9 a -4 logM; en estos experimentos también se hizo un control interno con HA 100 μ M con fines comparativos.

Todos los fármacos empleados en los experimentos con las células GT1-1, incluida la HA, fueron comprados a RBI (Natick, MA, USA).

De todos los experimentos, salvo el hecho con HA y triprolidina, se hicieron al menos tres réplicas (cada una por triplicado). En cada réplica, los promedios de los niveles de IPx obtenidos en cada uno de los triplicados se expresan como porcentaje del control. Los porcentajes obtenidos en las distintas réplicas de cada experimento se promediaron y se obtuvo la media y el EEM. Estos valores (la media de los porcentajes de las distintas réplicas) son los que se muestran en las figuras; en éstas también se muestra el EEM.

Los valores obtenidos en los distintos experimentos se expresan como porcentaje del control, que se toma como 100%. De esta manera, si un tratamiento produce un incremento de 20% (del control) sobre los niveles control, el aumento se expresa como un incremento de 120%.

- Estadística.

En cada uno de los distintos experimentos hechos con las células GT1-1, los resultados se expresan como la media de los porcentajes obtenidos en cada una de las réplicas de ese experimento.

Para asegurarnos de que las respuestas producidas por los distintos tratamientos experimentales, tanto en los cultivos primarios de adenohipófisis como en las células GT1-1, presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles, los resultados se analizaron con la prueba *t* de Student.

Se consideró que los resultados presentan una diferencia significativa con respecto al control cuando $P < 0.05$.

V- Resultados.

-Incrementos en los niveles de IPx como respuesta a la aplicación de TRH a células adenohipofisarias en cultivo: validación de la técnica.

Para asegurarnos sobre el correcto funcionamiento del método para separar IPx montado en el laboratorio, se midió la producción de IPx en células adenohipofisarias en cultivo primario en respuesta a la aplicación de TRH 1 uM. Es bien sabido que al menos algunos de los receptores de TRH en estas células están acoplados a la PLC (ver, por ejemplo, Fisher, 1992).

En 5 experimentos diferentes, cada uno por triplicado, fue posible ver casi una duplicación en los niveles de IPx después de incubar a las células por 15 min con TRH (Tabla 2). El incremento observado fue en promedio aproximadamente del 210% de los niveles basales (tomados como controles). Estos resultados indican que el método para medir IPx montado en el laboratorio sí funciona bajo nuestras condiciones, y que los resultados obtenidos con él pueden ser confiables y veraces.

Experimento	Control (cpm)	+ TRH (cpm)	% de estimulación
1	950.3 +/- 47.3	2182 +/- 235.11*	229.61
2	1686.81 +/- 156.66	2786 +/- 18.04*	165.16
3	1152.8 +/- 93.51	2179.8 +/- 223.57*	189.08
4	1565.72 +/- 70.98	3581.13 +/- 309.11*	228.72
5	1102.97 +/- 34.02	2722.3 +/- 132.17*	246.81
\bar{x}	1291.72 +/- 224.34	2690.2 +/- 406.62*	208.26

Tabla 2. Producción de IPx en respuesta a TRH 1 μ M aplicado por 15 min a cultivos primarios de adenohipófisis de rata. Los resultados se expresan como la media +/- EEM de determinaciones hechas por triplicado en cada experimento. Para expresar los resultados como % de estimulación, se tomó al control (niveles basales) como 100%. *, $P < 0.05$ vs. control.

-Producción de IPx en respuesta a HA en las células GT1-1: respuesta a diferentes concentraciones de HA, y curso temporal del efecto.

Con el fin de saber si la HA estimula, de manera directa, la producción de IPx en la línea GT1-1, se determinaron los incrementos en los niveles de IPx en respuesta a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μ M) de HA, aplicada durante 10 min (figs.10 y 11A).

En estos experimentos, los distintos IPx (IP1, IP2, IP3, e IP4) fueron eluidos cada uno por separado (fig.10). Como puede apreciarse en esta figura, los niveles tanto de IP1 como de IP2, expresados cada uno como porcentaje del nivel basal del IPx correspondiente, muestran un aumento significativo ($P < 0.05$ vs control) de alrededor de 140% del control a partir de 10 μ M, y de aproximadamente 150% del control con 100 μ M en ambos casos.

No fue posible detectar algún incremento significativo sobre los controles en los niveles de IP3 e IP4 con ninguna concentración de HA; esto quizá se deba al rápido metabolismo de los IP3, y a la relativamente baja abundancia de los IP4s.

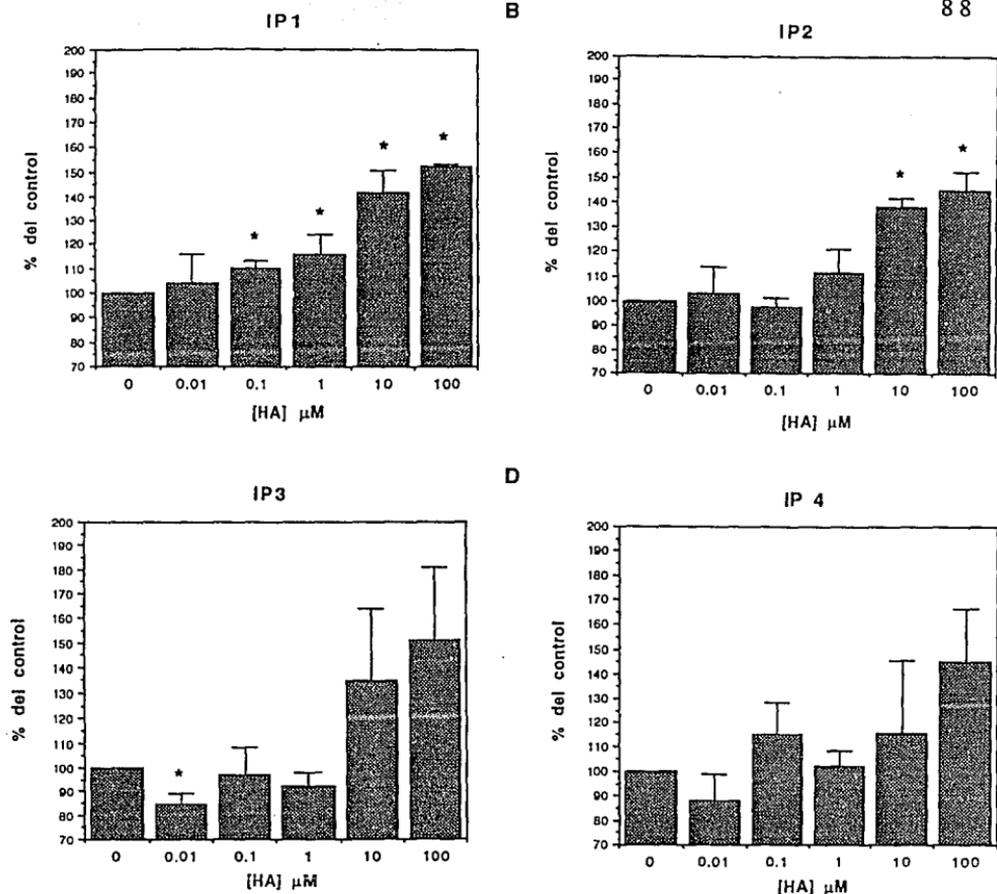


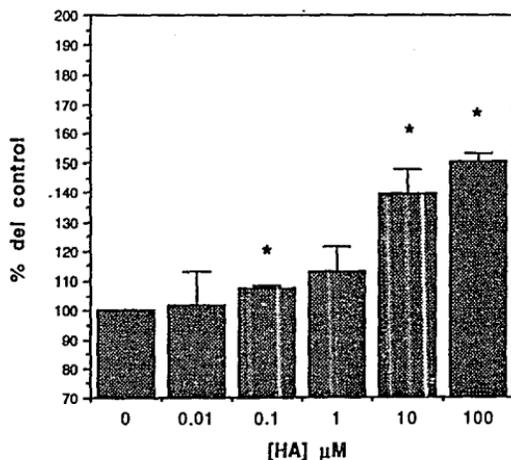
Fig. 10. Producción de IP1 (A), IP2 (B), IP3 (C) e IP4 (D) en respuesta a concentraciones crecientes de HA aplicadas por 10 min a células GT1-1. En este experimento se eluyeron por separado los distintos IPx. Los niveles de cada uno de los IPx se expresan como porcentaje del nivel basal del IP correspondiente. Los valores representan la media \pm EEM de los porcentajes obtenidos en 3 réplicas (cada una por triplicado).

Los niveles basales fueron de 5042.66 \pm 616.73 cpm para los IP1 (A); 1175.96 \pm 206.16 cpm para los IP2 (B); 366.83 \pm 33.56 cpm para los IP3 (C); y 343.13 \pm 33.5 cpm para los IP4 (D). Estos valores representan la media \pm EEM de los niveles basales de cada uno de los IPx, obtenidos en 3 réplicas (cada una por triplicado).

*, $P < 0.05$ vs control.

A

PRODUCCION DE IPx EN RESPUESTA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE HA



B

CURSO TEMPORAL DE LA PRODUCCION DE IPx EN RESPUESTA A HA

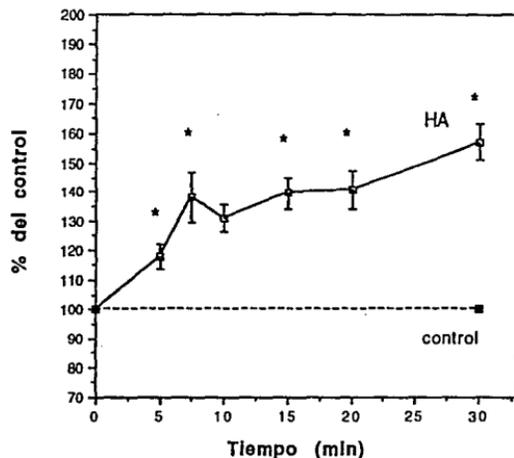


Fig. 11. Producción de IPx en la línea neuronal GT1-1 en respuesta a concentraciones crecientes de HA aplicada por 10 min (A), y curso temporal del efecto de HA 100 μM sobre la producción de IPx (B). Los niveles de IPx correspondientes a las distintas concentraciones de HA mostradas en (A), representan, para cada concentración, la suma de los valores de los 4 distintos IPx, eluidos por separado y producidos en respuesta a la respectiva concentración de HA (ver fig. 10). El nivel basal está representado de la misma manera. (B) Los niveles basales de IPx medidos a los 30 min no difirieron significativamente ($P < 0.05$), en ninguna réplica, de los niveles basales medidos a los 0 min. En este experimento se eluyeron en conjunto los distintos IPx.

Los niveles de IPx se expresan como porcentajes de sus respectivos niveles basales. Los valores representan la media \pm EEM de los porcentajes obtenidos de 3 (A) ó de 6 (B) réplicas (cada una por triplicado).

Los niveles basales fueron de 6928 \pm 876.54 cpm en los experimentos de respuesta dependiente de la concentración (A), y de 2636.21 \pm 371.77 cpm en los experimentos de curso temporal (B). Estos valores representan la media \pm EEM de los niveles basales de IPx de 3 (A) ó de 6 (B) réplicas (cada una por triplicado).

* $P < 0.05$ vs control.

Para conocer cuál es la producción total de IPx en respuesta a las distintas concentraciones de HA (fig.11A), se sumaron los valores de cada uno de los 4 IPx clúdos por separado y producidos en respuesta a la respectiva concentración de HA. El control está a su vez compuesto por la suma de los valores de los niveles basales de los 4 distintos IPx. La fig 11A muestra la media +/- EEM de los porcentajes obtenidos en tres réplicas de este experimento, cada una por triplicado.

En esta figura se observa un ligero pero significativo aumento en los niveles de IPx en respuesta a HA 0.1 uM; éste es de alrededor de 110% del control. Estos niveles se incrementan, aún más, en respuesta a HA 10 y 100 uM; con estas concentraciones se alcanzan valores de alrededor de 140 y 150% del control, respectivamente. Con 0.01 y 1 uM, no se observa ninguna diferencia significativa con respecto al control.

En la fig.11B se muestra el curso temporal de la producción de IPx en respuesta a HA 100 uM. Se empleó esta concentración ya que fue la que provocó una mayor producción de IPx en los experimentos de respuesta dependiente de la concentración. Entre los 0 y los 10 min, se puede observar una fase de aumento en los niveles de IPx; a los 5 min es ya posible observar diferencias significativas con respecto al control. A partir de los 10 y hasta los 20 min la respuesta parece alcanzar un "plateau" con niveles de aproximadamente 140% (similares al nivel obtenido en los experimentos de respuesta dependiente de la concentración, que es de 150%).

Finalmente, a los 30 min es posible observar un incremento de aproximadamente 160% con respecto a los niveles basales. En estos experimentos, se determinaron los niveles basales de IPx a los 0 y a los 30 min de incubación. Esto se hizo para asegurarnos de que no existe una contribución inespecífica a la producción de IPx durante el experimento; esta contribución podría estar generada por metabolismo celular, ó en respuesta al medio de incubación. En ninguno de los experimentos de curso temporal (6 en total) hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles de IPx basales determinados a esos tiempos.

-Efecto de agonistas H1, H2 y H3 histaminérgicos sobre la producción de IPx en la línea GT1-1.

Con el fin de determinar cuál es el tipo de receptor histaminérgico involucrado en la producción de IPx estimulada por HA, se probaron las capacidades de distintos agonistas de provocar una estimulación de la producción de IPx.

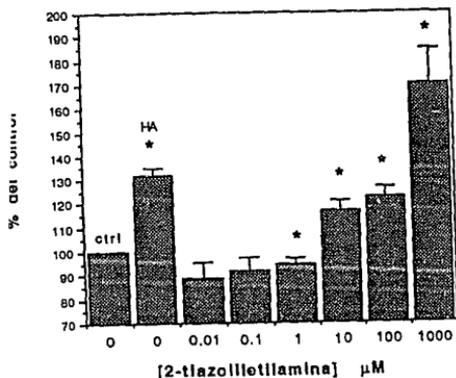
La 2-TEA es un agonista que es un orden de magnitud más potente sobre los receptores H1 que sobre los H2 (ver Hill, 1990). La producción de IPx en respuesta a la aplicación de diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 μM) de este agonista por 10 min se muestra en la fig.12A. Se empleó 10 min como tiempo de incubación, debido a que en ese tiempo es ya posible medir una respuesta significativa a la HA. Este tiempo además permite una comparación directa con los resultados obtenidos en los experimentos de respuesta dependiente de la concentración de HA. En los experimentos con 2-TEA también se aplicó HA 100 μM (por 10 min) como control interno.

En esta figura se puede apreciar que existen incrementos significativos en los niveles de IPx a partir de 2-TEA 10 μM y hasta 1 mM; con 10 y 100 μM es posible observar un incremento de aproximadamente 120% del control, y con 1mM se observa un aumento del 170%. Con 1 μM se observó una pequeña pero significativa disminución de los IPx con respecto al control, y con 0.01 y 0.1 μM no hubo diferencias significativas con el control.

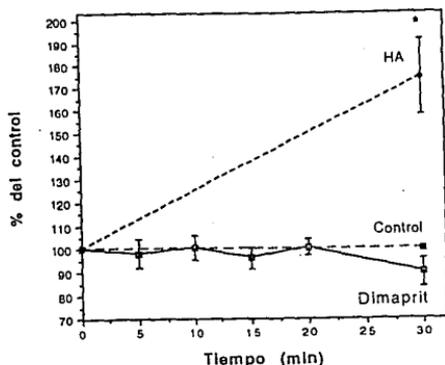
Para determinar la capacidad del dimaprit, un agonista selectivo H2, de provocar una respuesta sobre la producción de IPx, se hizo un curso temporal exploratorio con dimaprit 10 μM (no se muestran los resultados) para averiguar a qué tiempo tendría éste su efecto máximo. Como no fue posible observar ninguna respuesta con esa concentración, se hizo un experimento exploratorio de respuesta dependiente de concentración de dimaprit. En ese experimento se incubó por 30 min, que es, dentro de los tiempos probados, cuando la HA tiene un efecto máximo (no se presentan los resultados).

Como a ese tiempo y con distintas concentraciones el dimaprit tampoco tuvo ningún efecto detectable, se hizo un curso temporal con dimaprit 100 μM , considerada ésta como una concentración alta, con el objeto de indagar si existiría alguna respuesta al utilizar otros tiempos. En la fig.12B se puede apreciar que el dimaprit 100 μM , en ninguno de los tiempos probados, provocó cambios significativos ($P < 0.05$) en los

PRODUCCION DE IPx EN RESPUESTA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 2-TEA



B CURSO TEMPORAL DE LA RESPUESTA A DIMAPRIT



C CURSO TEMPORAL DE LA RESPUESTA A ALFA-MH

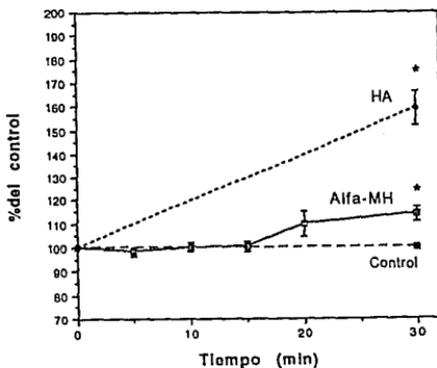


Fig. 12. Producción de IPx, en células GT1-1, en respuesta a concentraciones crecientes de 2-tiazoliletilamina (2-TEA, agonista H1) aplicada por 10 min (A); y cursos temporales de los efectos de dimaprit 100 μM (agonista H2) (B), y de alfa-metilhistamina (alfa-MH) 100 μM (agonista H3) (C), sobre la producción de IPx. En estos experimentos se aplicó HA 100 μM por 10 min (A) ó por 30 min (B y C) como control interno. Tanto en (B) como en (C), los niveles basales de IPx medidos a los 30 min no difirieron significativamente ($P < 0.05$), en ninguna réplica, de los niveles basales medidos a los 0 min. En todos estos experimentos se eluyeron los IPx en conjunto. Los niveles de IPx se expresan como porcentajes de sus respectivos niveles basales. Los valores representan la media \pm EEM de los porcentajes obtenidos en 3 (A y B) ó 7 (C) réplicas (cada una por triplicado). Los niveles basales fueron de 1605.15 \pm 197.23 cpm en los experimentos con 2-TEA (A); de 2248.53 \pm 252.48 cpm en los experimentos con dimaprit (B); y de 2597.87 \pm 198.2 cpm en los experimentos con alfa-MH (C). Estos valores representan la media \pm EEM de los niveles basales de IPx de 3 (A y B) ó de 7 (C) réplicas (cada una por triplicado). *, $P < 0.05$ vs control.

niveles de IPx. En estos experimentos también se determinaron los niveles basales de IPx a los 0 y a los 30 min; no existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles de IPx determinados a cada uno de esos 2 tiempos. Además, se probó el efecto de HA 100 μM sobre la producción de IPx a los 30 min, como control interno.

Finalmente, se probó la capacidad de la alfa-MH, un potente agonista H3, para inducir un aumento en los niveles de IPx. Para este fin, se hicieron 7 experimentos en los que se determinó el curso temporal del efecto de la alfa-MH 100 μM ; se empleó esa concentración, ya que es considerada como alta. Pensamos que si existiera algún efecto, tendríamos que observarlo al emplear esa concentración en distintos tiempos, mismos en los que se observan respuestas a la HA.

En la fig.12C puede observarse que no existen respuestas significativas durante los primeros 20 min; a los 30 min es posible notar un incremento pequeño pero significativo de alrededor de 115%. En estos experimentos también se hizo un control interno con HA 100 μM aplicada por 30 min.

-Efecto de antagonistas H1, H2 y H3 histaminérgicos sobre la producción de IPx en las células GT1-1.

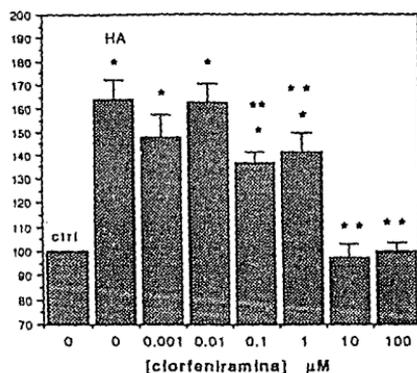
Con el objeto de tener mayor seguridad con respecto a la determinación de la identidad del tipo de receptor histaminérgico involucrado en la respuesta, se probaron las capacidades de distintos antagonistas H1, H2 y H3 de bloquear la estimulación de la producción de IPx inducida por HA.

En estos experimentos, se probaron las capacidades de distintas concentraciones (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM) de clorfeniramina (antagonista H1), de ranitidina (antagonista H2) y de tioperamida (antagonista H3), aplicadas cada una simultáneamente con HA 100 μM durante 30 min, para inhibir la producción de IPx estimulada por la HA (fig.13). En estos experimentos, también se determinaron los incrementos resultantes de la aplicación de HA 100 μM , en ausencia de antagonistas, como controles internos.

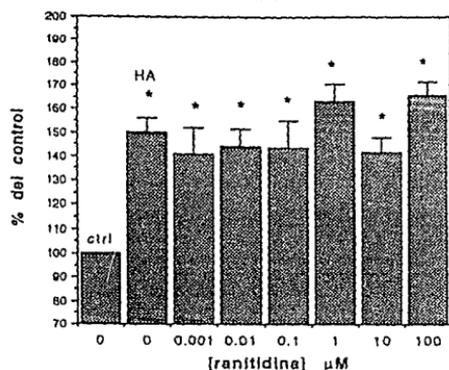
Como se puede apreciar en la fig.13A, la clorfeniramina pudo inhibir significativamente el efecto de la HA a partir de 0.1 μM . Con esta concentración y con 1 μM , los niveles de estimulación (aquí definidos como aquellos obtenidos al restar los

HA VS CLORFENIRAMINA

B



HA VS RANITIDINA



C

HA VS TIOPERAMIDA

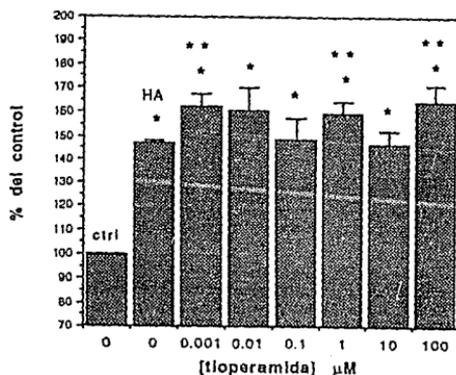


Fig. 13. Capacidades de distintas concentraciones de clorfeniramina (antagonista H1) (A), de ranitidina (antagonista H2) (B), ó de tioperamida (antagonista H3) (C), de bloquear la producción de IPx estimulada por HA 100 μM en las células GT1-1. Con excepción de los controles, las células fueron tratadas con HA 100 μM (como control interno), ó simultáneamente con HA 100 μM y una de distintas concentraciones de cada antagonista, durante 30 min. En todos estos experimentos se eluyeron los IPx en conjunto. Los niveles de IPx se expresan como porcentajes de sus respectivos niveles basales. Los valores representan la media \pm EEM de los porcentajes obtenidos en 3 (A) ó en 4 (B y C) réplicas (cada una por triplicado).

Los valores de los niveles basales fueron de 1681.29 \pm 129.88 cpm para los experimentos de HA vs clorfeniramina (A); de 1410.79 \pm 160.18 cpm para los experimentos de HA vs ranitidina (B); y de 1226.15 \pm 273.74 cpm para los experimentos de HA vs tioperamida (C). Estos valores representan la media \pm EEM de los niveles basales de IPx de 3 (A) ó de 4 (B y C) réplicas (cada una por triplicado).

*, $P < 0.05$ vs control; **, $P < 0.05$ vs HA 100 μM .

niveles basales de los niveles incrementados en respuesta al tratamiento) fueron de alrededor de 60% con respecto a los niveles de estimulación observados con HA (i.e., en ambos casos se restaron los niveles basales a los niveles estimulados, y los niveles resultantes se compararon). Con clorfeniramina 10 y 100 μM , se observó un bloqueo total de la respuesta a HA; los niveles de IPx tuvieron valores similares a los de los niveles basales.

Por otro lado, los niveles de IPx estimulados por HA no se vieron afectados significativamente por ninguna concentración de ranitidina (fig.13B).

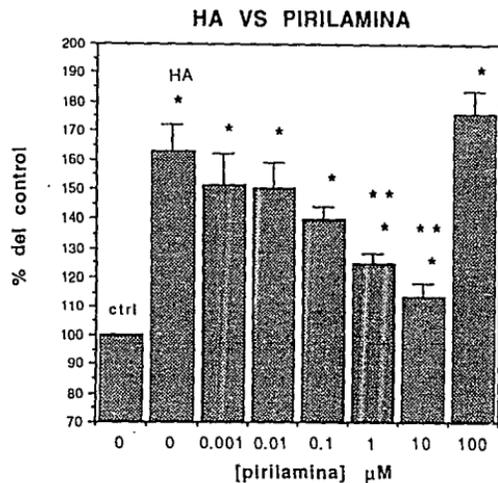
La tioperamida, al igual que la ranitidina, no tuvo efecto antagonista alguno sobre la respuesta a HA (fig.13C). Por el contrario, con tioperamida 0.001, 1 y 100 μM es posible observar incrementos significativos sobre los niveles de HA sola; de hecho, los niveles de estimulación (definidos como antes) de tioperamida 0.001, 1 y 100 μM fueron aproximadamente de 125%, 120% y 130% con respecto a los niveles de estimulación observados con HA (tomados como 100%), respectivamente.

Para confirmar el hallazgo de un efecto bloqueador ejercido por un antagonista H1 (clorfeniramina) sobre la producción de IPx estimulada por HA, se estudiaron las capacidades de otros dos antagonistas H1, pirilamina y triprolidina, de antagonizar la respuesta a la HA (fig.14). Los experimentos fueron conducidos de igual manera que los anteriores.

Las aplicaciones simultáneas de HA 100 μM y concentraciones crecientes de pirilamina tuvieron el efecto de disminuir la producción de IPx en respuesta a HA (fig.14A); el efecto antagonista es claro ($P < 0.05$) con pirilamina 1 y 10 μM . Los niveles estimulados fueron de 40% (pirilamina 1 μM) y de 20% (pirilamina 10 μM) de los niveles estimulados observados con HA. La pirilamina 100 μM (aplicada conjuntamente con HA), en vez de tener un esperado efecto antagonista, no inhibió la respuesta; el nivel alcanzado con esta concentración no fue significativamente diferente ($P < 0.05$) del nivel obtenido con HA sola.

En la fig.14B, puede apreciarse que la triprolidina también tuvo un efecto antagonista; a partir de 0.01 μM es posible ya observar un bloqueo significativo de la estimulación por HA. Los niveles estimulados por triprolidina 0.01 y 10 μM son un 60% de los niveles estimulados por HA, mientras que los niveles estimulados por triprolidina 0.1 y 1 μM son aproximadamente un 20% de los niveles estimulados por HA. Igual que con la pirilamina, los niveles alcanzados con triprolidina 100 μM no

A



B

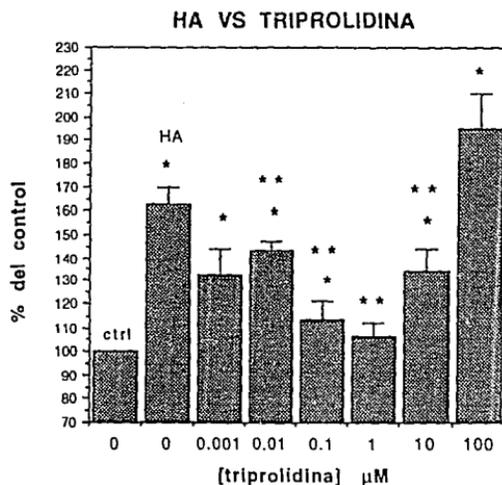


Fig. 14. Capacidades de distintas concentraciones de dos antagonistas H1, pirilamina (A) y triprolidina (B), de bloquear la producción de IPx estimulada por HA 100 μM en la línea neuronal GT1-1. Con excepción de los controles, las células fueron tratadas con HA 100 μM (como control interno), ó simultáneamente con HA 100 μM y una de distintas concentraciones de cada antagonista, durante 30 min. En estos experimentos, se eluyeron los IPx en conjunto.

Los niveles de IPx se expresan como porcentajes de sus respectivos niveles basales. Los valores representan la media \pm EEM de los porcentajes obtenidos en 3 (A) ó en 1 (B) réplicas (cada una por triplicado).

Los valores de los niveles basales fueron de 2450.44 \pm 401.53 cpm en los experimentos de HA vs pirilamina (A), y de 1837.6 \pm 63.01 cpm en los experimentos de HA vs triprolidina (B). Estos valores representan la media \pm EEM de de los niveles basales de IPx de 3 (A) ó de 1 (B) réplicas (cada una por triplicado).

*, $P < 0.05$ vs control; **, $P < 0.05$ vs HA 100 μM .

presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a los alcanzados con HA sola. Los resultados con triprolidina mostrados aquí se obtuvieron a partir de un sólo experimento, hecho por triplicado.

Para determinar si la ausencia de efecto antagonista de la pirlamina 100 μM fue un artificio experimental, ó si se debe a propiedades intrínsecas de ese fármaco, se determinó la producción de IPx en respuesta a distintas concentraciones (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM) de pirlamina, aplicada por 30 min y en ausencia de HA. En estos experimentos también se aplicó HA 100 μM , por el mismo tiempo, como control interno.

En la fig.15 se puede observar que este antagonista no produce ninguna respuesta entre 0.001 y 1 μM . Sin embargo, cuando fue aplicado en concentraciones de 10 y 100 μM , tuvo un efecto agonista. Los niveles de IPx producidos en respuesta a HA 100 μM aplicada por 30 min son generalmente de alrededor de 160% del control; la pirlamina 100 μM , aplicada sola por el mismo tiempo, provocó un aumento en los niveles de IPx de aproximadamente 180% con respecto al control.

PRODUCCION DE IPx EN RESPUESTA A
DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PIRILAMINA

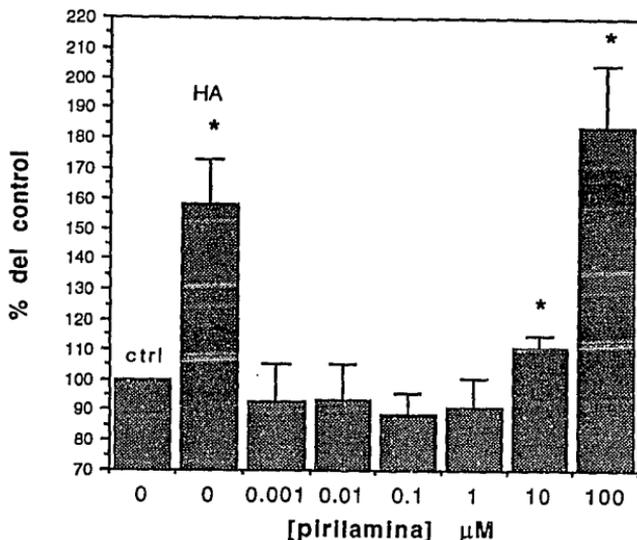


Fig.15. Producción de IPx en respuesta a concentraciones crecientes de pirilamina (antagonista H1), aplicadas durante 30 min a células GT1-1, en ausencia de HA. Como control interno y con fines comparativos, se determinó la producción de IPx en respuesta a HA 100 μM aplicada por el mismo tiempo. En este experimento, se eluyeron los IPx en conjunto. Los niveles de IPx se expresan como porcentajes del nivel basal. Los valores representan la media \pm EEM de los porcentajes obtenidos en 4 réplicas (cada una por triplicado).

El valor del nivel basal fue de 2460.4 \pm 439.46 cpm. Este valor representa la media \pm EEM de los niveles basales de IPx de 4 réplicas (cada una por triplicado).

*, $P < 0.05$ vs control.

VI-Discusión.

En este trabajo se demuestra, por primera vez, un efecto estimulador directo de la HA sobre la producción de IPx en la línea neuronal GT1-1. Esta respuesta es dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. En experimentos con distintos agonistas histaminérgicos, se encontró que la 2-TEA (agonista H1) tuvo el efecto de incrementar significativamente los niveles de IPx, mientras que ni el dimaprit ni la alfa-MH (agonistas H2 y H3, respectivamente), provocaron respuesta alguna.

En otros experimentos, se encontró que tanto la pirilamina como la clorfeniramina y la triprolidina, antagonistas H1 los tres, bloquean el efecto estimulador de la HA sobre la producción de IPx, mientras que ni la ranitidina (antagonista H2), ni la tioperamida (antagonista H3), inhiben significativamente el efecto de la HA.

Es interesante que la pirilamina por sí misma, a concentraciones altas, se comporta como un agonista; los mecanismos por los cuales este efecto se ejerce nos son desconocidos.

Los resultados obtenidos con los distintos agonistas y antagonistas, tomados en conjunto, indican que la producción de IPx en respuesta a HA en la línea neuronal GT1-1 está mediado por receptores H1. Todos los agonistas y antagonistas empleados son altamente específicos y selectivos, salvo la 2-TEA, cuya potencia relativa a la HA sobre los receptores H1 es sólo un orden de magnitud mayor que su potencia relativa a la HA sobre los receptores H2 (ver Hill, 1990).

Dado que:

- 1-La HA parece estimular, de manera directa, la secreción de GnRH en la línea GT1-1, al parecer por medio de receptores H1 (resultados inéditos del laboratorio).
- 2-En el presente trabajo se encontró que la HA está acoplada a la producción de IPx en esa línea neuronal, por medio de receptores H1.
- 3-Los receptores H1 se encuentran acoplados a la PLC en muchos tejidos (ver Hill, 1990; 1992).
- 4-En muchas instancias, la hidrólisis de fosfoinosítidos está acoplada a respuestas de secreción (ver Berridge, 1987).
- 5-La estimulación de la PKC en la línea GT1 produce un incremento en la secreción de GnRH (Wetsel et al., 1993).

6-No fue posible observar algún incremento en los niveles de cAMP en respuesta a HA en dicha línea (resultados inéditos del laboratorio).

es posible plantear la existencia de una cadena de relaciones causales entre la ocupación de los receptores H1 por HA; la estimulación de la PLC por esos receptores; la hidrólisis de fosfoinosítidos con la consecuente formación de Ins1,4,5P3 y DAG; y la secreción de GnRH en las células GT1-1, probablemente mediada por Ins1,4,5P3, Ca^{2+} y PKC.

De cualquier manera, si hubiera producción de IPx mediada por los otros dos tipos de receptores, entonces estos IPx no participarían directamente en la respuesta, ya que el bloqueo de los receptores H2 y H3 no inhibe la secreción provocada por HA.

Rigurosamente, aún quedaría por explorar si en estas células el receptor H1 activado por HA está acoplado, aparte de a la PLC, a algún otro efector que no sea la adenilato ciclasa (recuérdese que los niveles de cAMP no aumentan en respuesta a HA). Sin embargo, los receptores H1 están generalmente acoplados únicamente a la PLC en muchos tejidos (ver Hill, 1990; 1992).

Los resultados de este estudio confirman y extienden los hallazgos de Miyake et al. (1987). Estos autores observaron que la HA estimula la secreción de GnRH por hipotálamos mediobasales in vitro, y que esta respuesta es imitada por un agonista H1 pero no por uno H2, además de ser bloqueada por pirlamina. En esos estudios no se pudo esclarecer si el efecto de la HA es directo, ni se pudo identificar a la vía de comunicación intracelular involucrada.

Los datos de nuestro laboratorio sugieren que la HA estimula directamente la secreción de GnRH por neuronas GnRHérgicas. Además, aportan evidencias para la identificación de los receptores H1 como los mediadores de la respuesta, y de la hidrólisis de fosfoinosítidos como la vía de comunicación intracelular involucrada. Esto último también es apoyado por los resultados de Wetsel et al. (1993), quienes observaron un incremento en la secreción de GnRH al activar farmacológicamente a la PKC en la línea GT1-7. Los hallazgos del presente trabajo también contribuyen a resolver la controversia con respecto al tipo de receptor que media los efectos de la HA sobre la secreción de GnRH (ver sección 2.3 de este trabajo)

Si se consideran conjuntamente los hallazgos encontrados en hipotálamos y en las líneas neuronales GT1 (los nuestros y los de Wetsel et al., 1993), es posible sugerir con cierta confianza que in vivo la HA actúa en el hipotálamo directamente sobre las neuronas GnRHérgicas, donde modularía la secreción de GnRH por medio de receptores H1 acoplados a la hidrólisis de fosfoinosítidos.

Sin embargo, es preciso tener cautela con respecto a la generalización e interpretación de resultados obtenidos con las células GT1. Esta línea celular descende de células transformadas obtenidas a partir de un tumor, por lo que es posible que no refleje fielmente todos los aspectos de la biología de las neuronas GnRHérgicas in vivo. Por esta razón, es conveniente tratar de complementar a los estudios hechos en la línea GT1 con experimentos hechos en hipotálamos in vitro y/o in vivo.

Los mecanismos mediante los cuales los diversos agonistas acoplados a la PLC provocan la secreción de productos por distintas células no son conocidos en su totalidad. Es un hecho establecido que el Ca^{2+} participa en la secreción en un sinnúmero de tipos celulares; es muy probable que el Ca^{2+} que se libera de las pozas intracelulares como consecuencia de la activación de los receptores de $Ins1,4,5P_3$ participe en este fenómeno. El mecanismo por el cual el Ca^{2+} provoca la secreción es desconocido, aunque probablemente esté involucrado con la dinámica del citoesqueleto (ver Forscher, 1989; y sección II de esta tesis).

Por otro lado, algunas neuronas responden a niveles aumentados de $Ins1,4,5P_3$ con una hiperpolarización transitoria, seguida de una despolarización (ver Fink y Kaczmarek, 1988; Berridge, 1987; Jackson et al., 1987). Se ha observado que algunas neuronas en las que los niveles de $Ins1,4,5P_3$ aumentan en respuesta a bradicinina son capaces de secretar sus contenidos aún al estar hiperpolarizadas (ver Fink y Kaczmarek, 1988), lo que sugiere que el incremento en los niveles de Ca^{2+} producido por el $Ins1,4,5P_3$ es suficiente en esas células para provocar la secreción. Subsecuentemente las células parecen despolarizarse debido a la apertura de canales de Ca^{2+} operados por voltaje; esto aumentaría la disponibilidad de ese catión y seguramente facilitaría aún más la secreción.

Estudios realizados por Jorgenson et al. (1989) indican que la HA excita electrofisiológicamente a neuronas del núcleo arcuato por medio de receptores H1 in vitro; en esta zona del hipotálamo se encuentran muchas de las neuronas neurosecretoras. Esto sugiere que probablemente la HA sí es capaz de provocar

alteraciones electrofisiológicas en sus células blanco, y que lo haría por medio de la hidrólisis de fosfoinosítidos.

No obstante lo anterior, es posible que la activación de la vía de los IP α /DAG no tenga repercusiones electrofisiológicas importantes en las neuronas GnRHérgicas. En este sentido, sería interesante registrar la actividad electrofisiológica de las células GT1 al aplicar HA, y medir simultáneamente la secreción de GnRH. Esto podría hacerse en un medio sin Ca $^{2+}$, para cuantificar la posible participación del Ca $^{2+}$ extracelular en la secreción. Además, sería interesante medir en estas células los aumentos en la [Ca $^{2+}$] $_i$ en respuesta a HA, en medios con y sin Ca $^{2+}$ (o con EDTA), y determinar simultáneamente la secreción.

El hecho de detectar secreción aún en ausencia de actividad eléctrica, ó en un medio sin Ca $^{2+}$, sugeriría que la despolarización de la membrana no es imprescindible para que se dé la secreción. Lo anterior estaría en contradicción con la idea de que la secreción de GnRH a la sangre portal es consecuencia de la generación de potenciales de acción en las neuronas GnRHérgicas (ver Knobil, 1990). Más aún, otros neurotransmisores que producen secreción en estas células, tales como la DA y la NE (Martínez de la Escalera 1992a, 1992b), no producen efectos electrofisiológicos directos, sino que actúan por medio de la adenilato ciclasa. Sin embargo, estas células también son reguladas por agentes que producen efectos electrofisiológicos directos, como el GABA y el glutamato. Posiblemente algunas de las acciones de la HA sobre las neuronas GnRHérgicas consistan en la modulación de efectos electrofisiológicos.

Las células GT1 presentan pulsos intrínsecos y sincrónicos de secreción de GnRH (Martínez de la Escalera et al., 1992c; Wetsel et al., 1992); la frecuencia de estos pulsos es de aproximadamente 30 min. En el mono rhesus es posible ver una actividad eléctrica oscilatoria en el hipotálamo mediobasal, cuyos picos se correlacionan con aumentos en la secreción de LH (ver Knobil, 1990b; 1992). Estas y otras observaciones (ver sección 2.3 de este trabajo) sugieren que los niveles de GnRH secretados por las neuronas GnRHérgicas presentan, de manera intrínseca, una oscilación periódica, además de un pico pre-ovulatorio.

En la modulación de la amplitud y la frecuencia de los pulsos de secreción de una molécula mensajera dada está codificada aún más información relevante a la señal en cuestión. En este contexto, sería necesario analizar cómo varían la frecuencia y la

amplitud de los pulsos de GnRH en respuesta a HA, para definir de qué manera ejerce ésta su regulación.

Es posible que la estimulación con HA dure menos tiempo del necesario para completar un período de secreción intrínseca; en este caso, quizá la HA sólo provocaría aumentos en la amplitud de la secreción sin alterar la frecuencia. Si durara más tiempo, los niveles así elevados probablemente enmascararían (al menos en parte) a la oscilación intrínseca, por lo que la señal de la frecuencia desaparecería, se distorsionaría, ó se convertiría en otra. Probablemente la combinación del patrón intrínseco de secreción con aquel resultante de la estimulación genere nuevos patrones, mismos que codifican cierta información.

Además, diversos neuromediadores interactúan, quizá simultáneamente, con las neuronas GnRHérgicas. Por esta razón, existe en principio un número alto de posibles combinaciones de efectos que tienen como consecuencia la generación de patrones característicos de secreción (que codifican información). Sin embargo, es posible que los *outputs* generados por estas células estén compuestos sólo por un número pequeño de combinaciones de amplitudes con frecuencias, favorecidas por la selección natural y por las restricciones físicas de los seres vivos, que son armónicas y funcionales y que son señales con significados precisos para la hipófisis.

El significado fisiológico de la regulación por HA de la secreción de GnRH es desconocido. De manera similar, el papel que juega la HA dentro de la compleja red de regulaciones que controlan en última instancia la secreción de LH no está bien definido.

La HA está implicada, entre otras cosas, en la regulación de distintas funciones neuroendócrinas (ver Knigge y Warberg, 1991), y aparentemente media algunos de los efectos de los estrógenos sobre la secreción de GnRH (Ohtsuka et al., 1989). En el hipotálamo, la HA también está involucrada en la conducta (Alvarez y Banzán, 1992). A su vez, las neuronas HAérgicas pueden ser moduladas por otros sistemas, tales como el noradrenérgico, serotoninérgico, y glutamatérgico, entre otros (ver Wada et al., 1991; Okakura et al., 1992).

Las neuronas HAérgicas, cuyos cuerpos celulares se localizan en el núcleo tuberomamilar del hipotálamo, mandan proyecciones a casi todas las regiones cerebrales. Estas fibras, de naturaleza varicosa, casi nunca establecen contactos sinápticos con otras células (ver Wada et al., 1991). Lo anterior sugiere que la HA se

difunde, en casi todo el cerebro, en el espacio extracelular. Por medio de este último, alcanza a sus células blanco.

Todas las neuronas HAérgicas parecen tener el mismo patrón de funcionamiento, y aparentemente regulan actividades generales tales como el estado de alerta y el metabolismo energético (Wada et al., 1991). En el hipotálamo de la rata, existe un ritmo ultradiano de secreción de HA, con un período de 1-2 horas; estas oscilaciones están aparentemente compuestas por otras oscilaciones más pequeñas que tienen un período de 10-20 min. Además, existe un ritmo circadiano, en el que la mayor actividad se presenta en la noche (Philippu y Prast, 1991; Mochizuki et al., 1992).

Las observaciones anteriores, tomadas en conjunto, sugieren que las neuronas HAérgicas pueden conferir un patrón circadiano, y quizá ultradiano, a la actividad de casi todo el cerebro, mediante la modulación de dicha actividad. A este respecto, es posible que las neuronas HAérgicas, al secretar HA periódicamente al espacio extracelular, modulen de manera cíclica la actividad de las neuronas GnRHérgicas en el hipotálamo. De esta manera, la HA podría establecer un vínculo temporal entre la secreción intrínseca de GnRH y muchos otros procesos en el SNC.

Sin embargo, para esclarecer completamente el significado fisiológico de la regulación ejercida por HA, sería necesario conocer exactamente cuáles son las funciones del sistema HAérgico en el SNC, cuáles son sus propiedades intrínsecas, y al mismo tiempo, qué regulaciones se ejercen sobre dicho sistema.

VII- Conclusiones.

En el presente trabajo se demuestra que la HA estimula la producción de IPx en la línea neuronal hipotalámica GT1-1. Experimentos realizados con distintos agonistas y antagonistas histaminérgicos sugieren que esta respuesta está mediada por receptores H1.

Por otro lado, observaciones inéditas del laboratorio sugieren que la HA es capaz de inducir, de manera directa, la secreción de GnRH por estas células. Este efecto está mediado aparentemente también por receptores H1.

Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren la existencia de un efecto directo de la HA sobre la secreción de GnRH, mediado por receptores H1 acoplados positivamente a la PLC.

Los resultados del presente trabajo y los del laboratorio confirman y extienden los hallazgos de Miyake et al. (1987), en los que se demuestra que la HA provoca la secreción de GnRH por medio de receptores H1 en hipotálamos mediobasales de rata in vitro.

Nuestras observaciones, sumadas a las de Miyake et al., apuntan a la existencia de una acción de la HA sobre la secreción de GnRH in vivo, con las mismas características encontradas in vitro. Sin embargo, es preciso tener cautela con esta afirmación, ya que las células GT1-1 son neuronas transformadas que probablemente presentan alteraciones con respecto a la biología de las neuronas GnRHérgicas in vivo.

VIII- Bibliografía.

- Alvarez, E.O., y Banzán, A.M. (1992). The role of histamine in the anterior hypothalamus and its functional interaction with the hippocampus on exploratory behavior in adult male rats. *Behav. Brain. Res.* 48, 127-133.
- Akema, T., y Kimura, F. (1992). Modulation of pulsatile LH secretion by baclofen, a selective GABAB receptor agonist, in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 56, 141-147.
- Amundson, J. y Clapham, D. (1993). Calcium waves. *Current Opinion in Neurobiology* 3, 375-382.
- Asaoka, Y., Nakamura, S., Yoshida, K., y Nishizuka, Y. (1992). Protein kinase C, calcium, and phospholipid degradation. *Trends Biochem. Sci.* 17, 414-417.
- Ashkenazi, A., Peralta, E.G., Winslow, J.W., Ramachandran, J., y Capon, D.J. (1989). Functionally distinct G proteins selectively couple different receptors to PI hydrolysis in the same cell. *Cell* 56, 487-493.
- Bealer, S.L. (1993). Histamine releases norepinephrine in the paraventricular nucleus/anterior hypothalamus of the conscious rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, 734-738.
- Bell, R.M. (1986). Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 45, 631-632.
- Berridge, M.J., Downes, C.P., y Hanley, M.R. (1982). Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem. J.* 206, 587-595.
- Berridge, M.J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 159-193.
- Berridge, M.J. e Irvine, R.F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.

Bicknell, R.J. (1985). Endogenous opioid peptides and hypothalamic neuroendocrine neurones. *J. Endocr.* 107, 437-446.

Birdsall, N.J.M. (1991). Cloning and structure-function of the H2 histamine receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 9-10.

Blandina, P., Knott, P.J., Leung, L.K.H., y Green, J.P. (1989). Stimulation of histamine H2 receptor in rat hypothalamus releases endogenous norepinephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249, 44-51.

Bourgignon, J-P., Gerard, A. y Franchimont, P. (1989a). Direct activation of gonadotropin releasing hormone secretion through different receptors to neuroexcitatory amino acids. *Neuroendocrinology* 49, 402-408.

Bourgignon, J-P., Gerard, A., Mathieu, J., Simons, J. y Franchimont, P. (1989b). Pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone from hypothalamic explants is restrained by blockade of N-methyl-D,L-aspartate receptors. *Endocrinology* 125, 1090-1096.

Brann, D.W., y Mahesh, V.B. (1991a). Endogenous excitatory amino acid regulation of the progesterone- induced LH and FSH surge in estrogen-primed ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 53, 107-110.

Brann, D.W., y Mahesh, V.B. (1991b). Endogenous excitatory amino acid involvement in the preovulatory and steroid-induced surge of gonadotropins in the female rat. *Endocrinology* 128, 1541-1547.

Charli, J., Rotsztejn, W., Patou, E., y Kordon, C. (1978). Effect of neurotransmitters on in vitro release of luteinizing hormone-releasing hormone from the mediobasal hypothalamus of male rats. *Neurosci. Lett.* 159, 163.

Clapp, C., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Alcántara, E., López, F.J., Nagano, M., Kelly, P.A., Mejía, S., Morales, M.A., y Martínez de la Escalera, G. (1994). Prolactin gene is expressed in the hypothalamo-neurohypophyseal system and the protein is processed

into a 14 kDa fragment with 16K prolactin-like activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, en prensa.

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

Clarke, I.J., Phillips, D.J., Mercer, J.E., y Robertson, D.M. (1990). Mechanisms involved in the LH surge. En "Neuroendocrine regulation of reproduction". Yen, S.S.C., y Vale, W.W., eds. pp. 29-38. Serono Symposia USA, Norwell, MA, USA.

Colson, P., Ibarondo, J., Devilliers, G., Balestre, M.N., Duvold, A., y Guillon, G. (1992). Upregulation of V1a vasopressin receptors by glucocorticoids. Am. J. Physiol. 263 (Endocrinol. Metab. 26), E1054-E1062.

Daum, P.R., Downes, C.P., y Young, J.M. (1984). Histamine stimulation of inositol 1-phosphate accumulation in lithium-treated slices from regions of guinea pig brain. J. Neurochem. 43, 25-32.

Deckmyn, H., Van Geet, C., y Vermylen, J. (1993). Dual regulation of phospholipase C activity by G proteins. NIPS 8, 61-63.

DePaolo, L.V., King, R.A. y Carrillo, J.A. (1987). *In vivo* and *in vitro* examination of an autoregulatory mechanism for luteinizing hormone-releasing hormone. Endocrinology 120, 272-279.

Donoso, A.O. y Zárate, M.B. (1983). Release of prolactin and luteinizing hormone by histamine agonists in ovariectomized, steroid-treated rats under ether anesthesia. Exp. Brain Res. 52, 277-280.

Donoso, A.O. y Alvarez, E.O. (1984). Brain histamine as neuroendocrine transmitter. Trends Pharmacol. Sci. 6, 98-100.

Donoso, A.O., López, F.J., y Negro-Vilar, A. (1992). Cross-talk between excitatory and inhibitory amino acids in the regulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion. Endocrinology 131, 1559-1561.

Downes, C.P. (1988). Inositol phosphates: a family of signal molecules? *Trends Neurosci.* 11, 336-338.

Drouva, S.V., Epelbaum, J., Tapia-Arancibia, L., Laplante, E. y Kordon, C. (1981). Opiate receptors modulate LHRH and SRIF release from mediobasal hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 32, 163-167.

Fillicori, M., Flamigni, C., Campaniello, E., Ferrari, P., Meriggiola, M.C., Michelacci, L., Pareschi, A. y Valdiserri, A. (1989). Evidence for a specific role of GnRH pulse frequency in the control of the human menstrual cycle. *Am. J. Physiol.* 257 (Endocrinol. Metab. 20), E930-E936.

Findell, P.R., Wong, K.H., Jackman, J.K. y Daniels, D.V. (1993). B1-Adrenergic and dopamine (D1)-receptors coupled to adenylyl cyclase activation in GT1 gonadotropin-releasing hormone neurosecretory cells. *Endocrinology* 132, 682-688.

Fink, G. (1988). Gonadotropin secretion and its control. En "The physiology of reproduction". Knobil, E., y Neill, J. et al., eds. Raven Press, New York, NY, USA.

Fink, L., y Kaczmarek, L.K. (1988). Inositol polyphosphates regulate excitability. *Trends Neurosci.* 11, 338-339.

Fisher, S.K., Heacock, A.M., y Agranoff, B.W. (1992). Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: an update. *J. Neurochem.* 58, 18-38.

Flugge, G., Oertel, W.H. y Wuttke, W. (1986). Evidence for estrogen-receptive GABAergic neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area of the rat brain. *Neuroendocrinology* 43, 1-5.

Forscher, P. (1989). Calcium and polyphosphoinositide control of cytoskeletal dynamics. *Trends Neurosci.* 12, 468-474.

Fujimoto, K., Horio, Y., Sugama, K., Ito, S. Liu, Y.Q. y Fukui, H. (1993). Genomic cloning of the rat histamine H1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 190, 294-301.

Gantz, I., Schaffer, M., DelValle, J., Logsdon, C., Campbell, V. Uhler, M., y Yamada, T. (1991). Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 429-433.

González-Manchón, C., Bilezikjian, L.M., Corrigan, A.Z., Mellon, P.L. y Vale, W. (1991). Activin-A modulates gonadotropin-releasing hormone secretion from a gonadotropin-releasing hormone-secreting neuronal cell line. Neuroendocrinology 54, 373-377.

Haaksma, E.E.J., Leurs, R., y Timmerman, H. (1990). Histamine receptors: subclasses and specific ligands. Pharmac. Ther. 47, 73-104.

Haisenleder, D.J., Ortolano, G.A., Yasin, M., Dalkin, A.C., y Marshall, J.C. (1993). Regulation of gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression by gonadotropin-releasing hormone pulse amplitude *in vitro*. Endocrinology 132, 1292-1296.

Hales, T.G., Sanderson, M.J. y Charles, A.C. (1993). GABA has excitatory actions on GnRH secreting immortalized hypothalamic (GT1-7) neurons. Comunicacón personal.

Hanley, M.R., Jackson, T.R., Cheung, W.T., Dreher, M., Gatti, A., Hawkins, P., Patterson, S.I., Vallejo, M., Dawson, A.P., y Thastrup, O. (1988). Molecular mechanisms of phospholipid signaling pathways in mammalian nerve cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 53, 435-445.

Hawes, B.E. y Conn, P.M. (1990). GnRH-mediated actions in the gonadotrope. En "Neuroendocrine regulation of reproduction", Yen, S.S.C., y Vale, W.W., eds. pp. 219-238. Sero Symposia USA, Norwell, MA, USA.

Hayflick, J.S., Adelman, J.P. y Seeburg, P.H. (1989). The complete nucleotide sequence of the human gonadotropin-releasing hormone gene. Nucl. Acids Res. 17, 6403-6404.

Hazum, E. (1982). GnRH receptor of rat pituitary is a glycoprotein: differential effect of neuraminidase and lectins on agonists and antagonists binding. Mol. Cel. Endocrinol. 26, 217-222.

- Hepler, J.R., y Gilman, A.O. (1992). G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17, 383-387.
- Hill, S.J. (1990). Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol. Rev.* 42, 45-83.
- Hill, S.J. (1992). Histamine receptor agonists and antagonists. *Neurotransmissions* (publicado por Research Biochemicals Inc.) VIII, 1-8.
- Horno, N.M. y Alvarez, E.O. (1989). The probable role of histamine in the rostral hypothalamus on the prolactin and luteinizing hormone release induced by estrogen in conscious spayed rats. *J. Neural Transm. [Gen. Sect]* 78, 249-264.
- Irvine, R.F. (1992). Inositol lipids in cell signalling. *Current Opinion in Cell Biology* 4, 212-219.
- Jackson, T.R., Hallam, T.J., Downes, C.P. y Hanley, M.R. (1987). Receptor coupled events in bradykinin action: rapid production of inositol phosphates and regulation of cytosolic free Ca^{2+} in a neural cell line. *EMBO J.* 6, 49-54.
- Jorgenson, K.L., Kow, L-M., y Pfaff, D.W. (1989). Histamine excites arcuate neurons in vitro through H1 receptors. *Brain Res.* 502, 171-179.
- Knigge, U., y Warberg, J. (1991). The role of histamine in the neuroendocrine regulation of pituitary hormone secretion. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 124, 609-619.
- Knobil, E. (1990a). The GnRH pulse generator. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163, 1721-1727.
- Knobil, E. (1990b). Electrophysiological approaches to the hypothalamic GnRH pulse generator. En "Neuroendocrine regulation of reproduction". Yen, S.S.C., y Vale, W.W., eds. pp. 3-8. Sero Symposia USA, Norwell, MA. USA.
- Knobil, E. (1992). Remembrance: the discovery of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator and of its physiological significance. *Endocrinology* 131, 1005-1006.

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

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

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

Leposavic, G., Cover, P.O., y Buckingham, J.C. (1991). *In vivo* and *in vitro* studies on the opioidergic control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in sexually immature and adult male rats. Neuroendocrinology 53, 579-588.

Leranth, C., Maclusky, N., Salamoto, H., Shanabrough, M., y Naftolin, F. (1985). Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. Neuroendocrinology 40, 536-539.

Levine, J.E. y Duffy, M.T. (1988). Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats. Endocrinology 122, 2211-2221.

Levine, J.E., Strobl, F.J., Meredith, J.M., Vogelsong, K.M., Legan, S.J. y Urban, J.H. (1990). Neuroendocrine regulation of *in vivo* LHRH secretion in the rat. En "Neuroendocrine regulation of reproduction", Yen, S.S.C., y Vale, W.W., eds. pp. 47-61. Sero Symposium USA, Norwell, MA, USA.

Linder, M.E. y Gilman, A.G. (1992). G proteins. Sci. Am. 267(1), 36-43.

Liposits, Z., Merchenthaler, I., Wetsel, W.C., Reid, J.J., Mellon, P.L., Weiner, R.I., y Negro-Vilar, A. (1991). Morphological characterization of immortalized hypothalamic

neurons synthesizing luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 129, 1575-1583.

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

Mahachoklertwattana, P., Sanchez, J., Kaplan, S., y Grumbach, M.M. (1993). N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors mediate the release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) by NMDA in a hypothalamic GnRH neuronal cell line (GT1-1). Comunicación personal.

Majerus, P.W., Connolly, T.M., Deckmyn, H., Ross, T.S., Bross, T.E., Ishii, H., Bansal, V.S., y Wilson, D.B. (1986). The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science* 234, 1519-1526

Martínez de la Escalera, G., Gallo, F., Choi, A.L.H., y Weiner, R.I. (1992a). Dopaminergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via D1-receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology* 131, 2965-2971.

Martínez de la Escalera, G., Choi, A.L.H., y Weiner, R.I. (1992b). β 1-Adrenergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology* 131, 1397-1402.

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

Martínez de la Escalera, G., Mendoza, L., Ochoa, A. y Hol, D. (1993). Nuevas tendencias en el análisis experimental de la comunicación neuroendócrina: las células GT1. En "Comunicación neuroendócrina - bases celulares y moleculares". Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México D.F.

- Martínez de la Escalera, G. y Weiner, R.I. (1994). Biphasic GABAergic regulation of GnRH secretion in GT1 cell lines. *Neuroendocrinology* 59, 420-425.
- Masotto, C., Wisniewski, G. y Negro-Vilar, A. (1989). Different gamma-aminobutyric acid receptor subtypes are involved in the regulation of opiate-dependent and independent luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 125, 548-553.
- Medhamurty, R., Gay, V.L., y Plant, T.M. (1992). Repetitive injections of L-glutamic acid, in contrast to those of N-methyl-D,L-aspartic acid, fail to elicit sustained hypothalamic GnRH release in the prepubertal male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Neuroendocrinology* 55, 660-666.
- Mellon, P.L., Windle, J.J., Goldsmith, P.C., Padula, C.A., Roberts, J.L. y Weiner, R.I. (1990). Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5, 1-10.
- Merchenthaler, I., López, F.J., y Negro-Vilar, A. (1990). Colocalization of galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in a subset of preoptic hypothalamic neurons: Anatomical and functional correlates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6326-6330.
- Mitsuhashi, M. y Payan, D.G. (1992). Functional diversity of histamine and histamine receptors. *J. Invest. Dermatol.* 98, 8S-11-S.
- Miyake, A., Ohtsuka, S., Nishizaki, T., Tasaka, K., Aono, T., Tanizawa, O., Yamatodani, A., Watanabe, T., y Wada, H. (1987). Involvement of H1 histamine receptor in basal and estrogen-stimulated luteinizing hormone-releasing hormone secretion in rats in vitro. *Neuroendocrinology* 45, 191-196.
- Mochizuki, T., Yamatodani, A., Okakura, K., Horii, A., Inagaki, N. y Wada, H. (1992). Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. *Physiol. Behav.* 51, 391-394.
- Moolenaar, W.H. (1991). G-protein-coupled receptors, phosphoinositide hydrolysis, and cell proliferation. *Cell Growth & Differentiation* 2, 359-364.

- Nahorski, S.R. (1988). Inositol polyphosphates and neuronal calcium homeostasis. *Trends Neurosci.* 11, 444-448.
- Nahorski, S.R., Ragan, C.I., y Challiss, R.A.J. (1991). Lithium and the phosphoinositide cycle: an example of uncompetitive inhibition and its pharmacological consequences. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 297-303.
- Nakai, Y., Plant, T.M., Hess, D.L., Keogh, E.J. y Knobil, E. (1978). On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 102, 1008-1014.
- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.
- Ohtsuka, S., Nishizaki, T., Tasaka, K. Miyake, A., Tanizawa, O., Yamatodani, A. y Wada, H. (1989). Estrogen stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat hypothalamus independently through catecholamine and histamine in vitro. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 120, 644-648.
- Okakura, K., Yamatodani, A., Mochizuki, T, Horii, A. y Wada, H. (1992). Glutamatergic regulation of histamine release from rat hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* 213, 189-192.
- Page, R.B. (1988). The anatomy of the hypothalamo-hypophyseal complex. En "The Physiology of Reproduction", Knobil, E. y Neill, J., et al., eds. pp. 1161-1234. Raven Press, Ltd. New York USA.
- Pagesy, P., Li, J.Y., Berthet, M. y Peillon, F. (1992). Evidence of gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat anterior pituitary. *Mol. Endo.* 6, 523-528.
- Parsons, M.E. (1991). Histamine receptors: an overview. *Scand. J. Gastroenterol.* 26(suppl 180), 46-52.
- Parthasarathy, R., y Eisenberg, F. Jr. (1986). The inositol phospholipids: a stereochemical view of biological activity. *Biochem. J.* 235, 313-322.

Pazin, M.J., y Williams, L.T. (1992). Triggering signaling cascades by receptor tyrosine kinases. *Trends Biochem. Sci.* 17, 374-378.

Pfaff, D.W., Kow, L-M., Bergen, H. y Schwanzel-Fukuda, M. (1990). Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH, GnRH) neurons as they develop and affect other neurons. En "Neuroendocrine regulation of reproduction". Yen, S.S.C., y Vale, W.W., eds. pp. 71-94. Serono Symposia USA, Norwell, MA, USA.

Philippu, A. y Prast, H. (1991). Patterns of histamine release in the brain. *Agents and Actions* 33, 124-125.

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

Pollard, H., Moreau, J., Arrang, J.M., y Schwartz, J.C. (1993). A detailed autoradiographic mapping of histamine H3 receptors in rat brain areas. *Neuroscience* 52, 169-189.

Prell, G.D. y Green, J.P. (1986). Histamine as a neuroregulator. *Ann. Rev. Neurosci.* 9, 209-254.

Putney, J.W. Jr., Takemura, H., Hughes, A.R., Hortsman, D.A., y Thastrup, O. (1989). How do inositol phosphates regulate calcium signaling? *FASEB J.* 3, 1899-1905.

Radovick, S., Ticknor, C.M., Nakayama, Y., Notides, A.C., Rahman, A., Weintraub, B.D., Cutler, G.B.Jr., y Wondisford, F.E. (1991). Evidence for direct estrogen regulation of the human gonadotropin-releasing hormone gene. *J. Clin. Invest.* 88, 1649-1655.

Rhee, S.G., y Choi, K.D. (1992). Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 267, 12393-12396.

Ross, C.A., Meldolesi, J., Milner, T.A., Satoh, T., Supattapone, S., y Snyder, S.H. (1989). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Nature* 339, 468-470.

- Ruat., M., Traiffort, E., Arrang, J.-M., Leurs, R. y Schwartz, J.-C. (1991). Cloning and tissue expression of a rat histamine H₂-receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179, 1470-1478.
- Russell, W.L. Henry, D.P., Phebus, L.A., y Clemens, J.A. (1990). Release of histamine in rat hypothalamus and corpus striatum *in vivo*. *Brain Res.* 512, 95-101.
- Sarkar, D.K. (1987). *In vivo* secretion of LHRH in ovariectomized rats is regulated by a possible autofeedback mechanism. *Neuroendocrinology* 45, 510-513.
- Sastry, P.S., Dixon, J.F., y Hokin, L.E. (1992). Agonist-stimulated inositol polyphosphate formation in cerebellum. *J. Neurochem.* 58, 1079-1086.
- Schell, M.J., Danoff, S.K., y Ross, C.A. (1993). Inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor: characterization of neuron-specific alternative splicing in rat brain and peripheral tissues. *Mol. Brain Res.* 17, 212-216.
- Schwanzel-Fukuda, M. y Pfaff, D.W. (1989). Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338, 161-164.
- Shivers, B.D., Harlan, R.E., Morrell, J.I., y Pfaff, D.W. (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature (Lond.)* 304, 345-347.
- Silverman, A.-J. (1988). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry. En "The physiology of reproduction". Knobil, E, y Neill, J. et al., eds. pp.1283-1304. Raven Press, New York, NY, USA.
- Silverman, A.-J., Roberts, J.L., Dong, K.-W., Miller, G.M. y Gibson, M.J. (1992). Intrahypothalamic injection of a cell line secreting gonadotropin-releasing hormone results in cellular differentiation and reversal of hypogonadism in mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10668-10672.
- Smith, M.A. y Vale, W.W. (1981). Desensitization to gonadotropin-releasing hormone observed in superfused pituitary cells on cytodex beads. *Endocrinology* 108, 752-759.

- Stojilkovic, S.S., Merelli, F., Iida, T., Krsmanovic, L.Z. y Catt, K.J. (1990). Endothelin stimulation of cytosolic calcium and gonadotropin secretion in anterior pituitary cells. *Science* 248, 1663-1666.
- Taylor, C.W., y Marshall, I.C.B. (1992). Calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a complex relationship. *Trends Biochem. Sci.* 17, 403-407.
- Timmerman, H. (1989). Histamine receptors in the central nervous system. *Pharmaceutisch Weekblad scientific edition* 11, 146-150.
- Timmerman, H. (1992). Cloning of the histamine H1 receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 6-7.
- Tougaard, C. y Tixier-Vidal, A. (1988). Lactotropes and gonadotropes. En "The Physiology of Reproduction", Knobil, E. y Neill, J., et al., eds. pp. 1305-1334. Raven Press, Ltd. New York USA.
- Traiffort, E., Ruat, M., Arrang, J-M., Leurs, R., Piomelli, D. y Schwartz, J-C. (1992a). Expression of a cloned rat histamine H2 receptor mediating inhibition of arachidonate release and activation of cAMP accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2649-2653.
- Traiffort, E., Pollard, H., Moreau, J., Schwarz, J.C., Martínez-Mir, M.I., y Palacios, J.M. (1992b). Pharmacological characterization and autoradiographic localization of histamine H2 receptors in human brain identified with [¹²⁵I]-iodoaminopotentidine. *J. Neurochem.* 59, 290-299.
- van der Werf, J.F. y Timmerman, H. (1989). The histamine H3 receptor: a general presynaptic histaminergic regulatory system?. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 159-162.
- Van Kirk, E.A., Halterman, S.D., Moss, G.E., Rose, J.D., y Murdoch, W.J. (1989). Possible role of histamine in the regulation of secretion of luteinizing hormone in the ewe. *J. Anim. Sci.* 67, 1006-1012.

Wada, H., Inagaki, N., Yamatodani, A., y Watanabe, T. (1991). Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity?. *Trends Neurosci.* 14, 415-418.

Wang, X., Treisman, S.N., Wilson, A., Nordmann, J.J. y Lemos, J.R. (1993). Ca²⁺ channels and peptide release from neurosecretory terminals. *NIPS* 8, 64-68.

Weiner, R.I., Findell, P.R., y Kordon, C. (1988). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin. En "The Physiology of Reproduction", Knobil, E. y Neill, J. et al., eds. pp. 1235-1281. Raven Press, Ltd. New York USA.

Wetsel, W.C., Mellon, P.L., Weiner, R.I. y Negro-Vilar, A. (1991). Metabolism of pro-luteinizing hormone-releasing hormone in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology* 129, 1584-1595.

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

Wetsel, W.C., Eraly, S.A., Whyte, D.B. y Mellon, P.L. (1993). Regulation of gonadotropin-releasing hormone by protein kinase-A and -C in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology* 132, 2360-2370.

Widmer, H.R., Kaplan, D.R., Rabin, S.J., Beck, K.D., Hefti, F., y Knussel, B. (1993). Rapid phosphorylation of phospholipase C gamma-1 by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in cultures of embryonic rat cortical neurons. *J. Neurochem.* 60, 2111-2123.

Witkin, J.W., Ferin, M., Popilskis S.J., y Silverman, A-J. (1991). Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology* 129, 1083-1092.

Wojcikiewicz, R.J.H., Tobin, A.B., y Nahorski, S.R. (1993). Desensitization of cell signalling mediated by phosphoinositidase C. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 279-285.

Yamashita (1991). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 11515-11519.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., y Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 332, 411-415.

Zweig, A., Siegel, M.I., Egan, R.W., Clark, M.A., Shorr, R.G.L., ly West, R.E. Jr. (1992). Characterization of a digitonin-solubilized bovine brain H3 histamine receptor coupled to a guanine nucleotide-binding protein. J. Neurochem. 59, 1661-1666.