

03040



CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE ADENILATO  
CICLASA SENSIBLES A CALCIO EN LAS CÉLULAS  $GT_{1-7}$ .

Cecilia Martín González

Entidad Académica, Instituto de Neurobiología

Universidad Nacional Autónoma de México

Tesis que presenta la pasante Cecilia Martín González, como un requisito para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Dirigida por el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Campus Juriquilla, Querétaro. Agosto del 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

LA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## Agradecimientos

A Jorge que pacientemente me ha acompañado y que no tengo palabras para expresarle todo lo que siento por él y lo mucho que agradezco su apoyo incondicional =(=

A mis padres Rubén y María Elena que con todo su cariño me han apoyado junto a mis hermanas Sandra y Mariana. Y a mi más reciente familia, los señores Jorge y Nuri, así como a Nuri, Salvador y a mi hermanito Andrés.

A mi tutor, el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera por todo su cariño y apoyo en mi formación. Asimismo, agradezco la especial colaboración de la Dra. Carmen Clapp.

A mi comité tutorial por su paciencia y excelente dirección: Dr. Juan Riesgo Escovar y al Dr. Mauricio Díaz Muñoz. Y a los miembros del jurado que realizaron valiosas observaciones que enriquecieron este trabajo de tesis: Dr. Luis Vaca Domínguez, Dra Brenda Anguiano Serrano y al Dr. Rogelio Arellano Ostoa.

A mis compañeros de laboratorio que continuamente me apoyaron y dieron su amistad: Gaby, Héctor, Yazmín, Pavel, Carlitos, Jessica Guzmán, Jessica Jacobi, Mónica, Miriam, Celina. De igual manera agradezco el apoyo técnico y cariño del Dr. Michael C. Jeziorski, M. en C. Gabriel Nava Pinto, Dra. Ma. del Carmen González Castillo, Nut. Fernando López Barrera y de los laboratoristas Antonio Prado Galán y Daniel Mondragón Huerta.

A mis compañeros de maestría que me brindaron su amistad: Berta, Edith, Luis, Lety, Luci, Lupe, Gely, Gloria, Carlota, Liliana, Sofi y Juan Carlos.

Agradezco especialmente a las personas que con toda su paciencia hicieron más sencilla mi estancia en la maestría: Q. Leonor Casanova Rico, María del Carmen Vázquez Rodríguez, Yolanda Orduña Cruz, Magdalena Reyes Olán e Isabel Bolaños del departamento de posgrado.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: P.A. Paula BECERRILLO  
PELUEZ

FECHA: 02 JULIO/2007

FIRMA: [Firma]

Asimismo, agradezco todo el apoyo recibido a los miembros de la biblioteca del Instituto de neurobiología: Bib. Pilar Galarza Barrios, Elsa Olivia Ruiz Martínez, Ignacio Caballero Navarro, Rafael Silva Cruz y Ma. Carmen Jiménez de Loera. De igual manera, agradezco el apoyo del MZV. Martín García Servín. Y por último, pero no menos importante a la Unidad de Biología Molecular dirigida por la Dra. Anaid Antaramián Salas.

Agradezco el apoyo brindado por el CONACyT No. De contrato: 165474 y de la DGEP-UNAM durante el curso de la maestría y para la realización de este trabajo.

## INDICE

	Página
Resumen	1
Summary	2
Introducción	3
Antecedentes inmediatos	5
1. Control neuroregulatorio de la reproducción	5
2. Desarrollo de las neuronas GnRHérgicas	6
3. Características anatómicas de las neuronas GnRHérgicas	7
4. Línea celular inmortalizada GT1	7
5. Relevancia de la pulsatilidad en las neuronas GnRHérgicas	10
6. Regulación aferente de la secreción de la GnRH	12
7. Regulación GABAérgica del eje reproductivo	14
7.1 Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)	15
8. Acción del GABA en la línea celular GT1	16
9. Vías de señalización implicadas en la secreción de la GnRH	19
9.1 Generalidades del calcio	19
9.2 Acción del calcio en la línea celular GT1	20
9.3 Generalidades del AMPc y la adenilato ciclasa	21
9.4 Acción del AMPc en la línea celular GT1	23
Planteamiento del problema y justificación	24
Hipótesis	26
Objetivos	26
Metodología experimental	27
1) Cultivo de células GT1-7	27
2) Diseño de oligonucleótidos	27
3) Extracción de ARN	28
4) Retrotranscripción y amplificación por RT-PCR	28
5) Clonación de fragmentos genómicos de las adenilato ciclasas	30
6) PCR cuantitativo en tiempo real	30
Resultados	34

Estandarización de la extracción del ARN total y condiciones de la PCR	34
Análisis de la expresión de las adenilato ciclasas sensibles a calcio	37
Curva de estandarización de la adenilato ciclasa tipo I	40
Curva de estandarización de la adenilato ciclasa tipo III	42
Curva de estandarización de la adenilato ciclasa tipo V	44
Curva de estandarización de la adenilato ciclasa tipo VI	46
Estandarización de la PCR en tiempo real	49
Importancia del tamaño del producto de amplificación en la PRC en tiempo real	49
Cuantificación de la adenilato ciclasa tipo I	52
Cuantificación de la adenilato ciclasa tipo III	54
Cuantificación de la adenilato ciclasa tipo V	55
Cuantificación de la adenilato ciclasa tipo VI	57
Discusión	63
Referencias	69
Apéndice I (Secuenciación de las adenilato ciclasas tipo I, III, V, VI y VIII)	

## RESUMEN

La secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) controla la función reproductiva en mamíferos, y está regulada por múltiples neurotransmisores incluyendo el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). En la línea GnRHérgica inmortalizada GT<sub>1.7</sub>, este neurotransmisor produce un efecto bifásico consistente en una activación rápida de la liberación de GnRH acompañada de un aumento previo de la concentración intracelular del calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ), seguida de un período de inhibición con duración de varios minutos en ambos parámetros. Esta última fase coincide en el tiempo con una marcada disminución de la concentración intracelular del AMP cíclico ( $[AMPc]_i$ ). En este trabajo nos propusimos investigar si la disminución de la  $[AMPc]_i$  es producto del incremento rápido de la  $[Ca^{2+}]_i$ , puesto que se han caracterizado al menos 5 isoformas de la adenilato ciclasa (AC) sensibles a las variaciones fisiológicas de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Se sabe que las isoformas clasificadas como tipo V y VI se inhiben por incrementos de la  $[Ca^{2+}]_i$  en concentraciones fisiológicas, mientras que las tipo I y VIII se activan en estas mismas condiciones. La AC III ha sido clasificada dentro de esta últimas, pero su modulación por calcio es controversial. De los antecedentes señalados se desprende la hipótesis de que las células GT<sub>1.7</sub> expresarían al menos una de las formas inhibibles de ACs (V y VI). Para comprobar esta hipótesis analizamos por RT-PCR la expresión de los ARN mensajeros correspondientes a las ACs mencionadas. En extractos de células GT<sub>1.7</sub> detectamos la expresión del ARN mensajero de las ACs tipo I, III, V y VI. No detectamos la presencia de la AC tipo VIII. Al encontrar una población mixta de ACs regulables por calcio nos propusimos estudiar la abundancia relativa de expresión de las ACs por el método de PCR cuantitativo, encontrando que las ACs I y III se expresaron con una abundancia relativa de  $20,964 \pm 815.7$  y  $624,583 \pm 24,479.2$  copias de ARNm/ $\mu$ g de ARN total, respectivamente. Por su parte, las ACs V y VI se expresaron con una abundancia relativa de  $345,033 \pm 8,796.6$  y  $105,222 \pm 11,048.1$  copias de ARNm/ $\mu$ g de ARN total, respectivamente. Estos resultados son consistentes con la hipótesis propuesta, dado que las AC inhibibles están presentes en mucha mayor proporción que las isoformas activables tipo I y VIII. Respecto a la AC III, el efecto del calcio sobre esta isoforma es aún controversial ya que en ciertas condiciones puede incluso llegar a ser inhibida por calcio. Por esta razón, un aumento en calcio produciría una disminución putativa en la  $[AMPc]_i$ , y para confirmar esta hipótesis proponemos analizar el efecto neto que tiene el incremento fisiológico de la  $[Ca^{2+}]_i$  sobre la actividad enzimática de la población global de ACs en las células GT<sub>1.7</sub>.

## SUMMARY

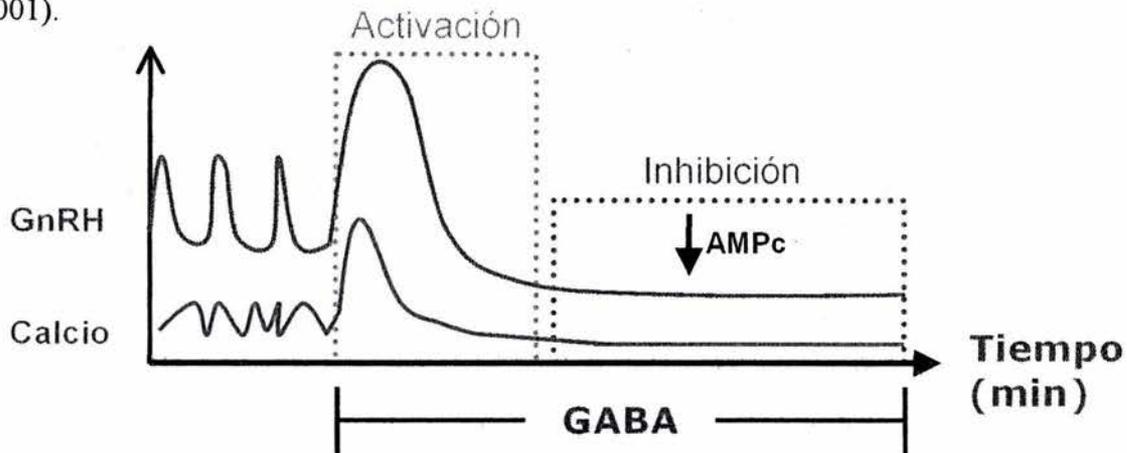
In mammals, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) controls the reproductive function. This neuropeptide is regulated by multiple neurotransmitters, including  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). It has been shown that administration of GABA to the GT<sub>1</sub> cell line produces a biphasic effect, which has been described as a transient activation of GnRH release with a previous increase in intracellular calcium concentration, followed by a long-lasting inhibition of both parameters. In addition, a decrease in cyclic AMP (cAMP) synthesis has been described. In this study, we propose that the decrease in cAMP levels is the consequence of the transient calcium increase. At the moment, five isoforms of calcium-sensitive adenylyl cyclases (ACs) have been described. Isoforms V and VI are inhibited by calcium increases, while isoforms I and VIII are stimulated. Isoform III has been included in the last category, although conflicting results have recently emerged. Based on this information, we hypothesized that the GT<sub>1-7</sub> cells express at least one of the calcium-inhibited isoforms (V and/or VI). To test this theory, we analyzed the expression of calcium-sensitive AC encoding mRNA by RT-PCR. Our results show the expression of mRNA encoding type I, III, V and VI ACs. However, type VIII AC was absent. We also analyzed the relative abundance of AC isoforms by quantitative PCR. AC I and III are expressed at a level of  $20964 \pm 815.7$  and  $624583 \pm 24479.2$  copies of mRNA/ $\mu$ g total RNA, respectively. On the other hand, AC type V and VI are expressed at levels of  $345033 \pm 8796.6$  y  $105222 \pm 11048.1$  copies of mRNA/ $\mu$ g total RNA, respectively. Even though the high level of expression of mRNA for AC III is in apparent contradiction with our hypothesis, this result may not be reflected in AC activity. This results are consistent with our hypothesis because the calcium-inhibited isoforms (V and VI) are present in a larger proportion than the calcium-activated isoforms (I and VIII). The expectation that an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  would result in a decrease in  $[AMPc]_i$  could be directly tested by the determination of AC enzymatic activity in response to calcium in the GT<sub>1-7</sub> cell line.

## INTRODUCCIÓN

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH por sus siglas en inglés) es esencial en la regulación de la función reproductiva en mamíferos. Este neuropéptido se secreta de forma pulsátil por un grupo muy pequeño de neuronas hipotálamicas distribuidas de forma heterogénea, de las cuales únicamente aquellas que dirigen sus axones hacia la eminencia media y descargan sus productos de secreción en el sistema portal son relevantes para la función reproductiva (Silverman *et al.*, 1987). La reproducción no es un evento aislado, sino un proceso complejo de integración de información externa e interna. Los factores externos o de tipo ambiental incluyen, entre otros muchos el período de luz-oscuridad, la temperatura y señales sensoriales provenientes del género opuesto. Asimismo, entre los factores internos que influyen en la secreción de la GnRH están el estado metabólico, las emociones y la retroalimentación de los esteroides gonadales. Esto se complementa con interacciones neuroendócrinas en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Ver: Martínez de la Escalera *et al.*, 2002).

Se ha demostrado la participación de un gran número de neurotransmisores y neuromoduladores, que interactúan directa ó indirectamente con las neuronas que secretan a la GnRH (Weiner *et al.*, 1987). El ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) es uno de los más importantes moduladores de las neuronas GnRHérgicas. Por medio de técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado que las neuronas GABAérgicas innervan directamente a las neuronas GnRHérgicas (Jennes *et al.*, 1983). Además, existen evidencias obtenidas de experimentos *in vivo* que apoyan que el GABA juega un papel fundamental en la fisiología de la reproducción. En la embriogénesis, se ha reconocido al GABA como un factor trófico en la migración neuronal GnRHérgica (Tobet *et al.*, 1996 y Bless *et al.*, 2000). Asimismo, es considerado como un posible inhibidor de la secreción de la GnRH desde el período prenatal hasta el inicio de la pubertad (Keen *et al.*, 1999 & Kasuya *et al.*, 1999). En adultos, el GABA modula la actividad pulsátil de secreción de la GnRH en ovejas (Pompolo *et al.*, 2003 & Scott, Clarke., 1993).

En experimentos *in vitro* se ha descrito que la administración continua del GABA en la línea celular inmortalizada GT1 (ver Figura 1) induce un evento bifásico donde la secreción de la GnRH se incrementa de forma transitoria y esto es seguido por un período de inhibición prolongado con duración de varios minutos, en el cual se pierde el comportamiento oscilatorio característico y se reducen los niveles de liberación de este neuropéptido por debajo del basal (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). En esta misma línea celular, la administración del GABA influye también en la concentración intracelular del calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ), resultando en un rápido incremento en los niveles intracelulares de este ión, que precede a una disminución de la concentración intracelular del calcio a niveles por debajo del basal y se acompaña de la pérdida del comportamiento oscilatorio (Hales *et al.*, 1994 & Sun *et al.*, 1997). De igual manera, mediante estrategias farmacológicas se ha determinado que este efecto del GABA sobre la secreción de la GnRH y los niveles de calcio intracelular son mediados por el receptor del GABA<sub>A</sub> (Hales *et al.*, 1994 & Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001) y se descartó el efecto del receptor GABA<sub>B</sub> (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001).



**Figura 1.** Representación esquemática que ilustra el efecto que tiene el GABA en las células GT<sub>1-7</sub>. Este neurotransmisor produce un efecto bifásico sobre la secreción de la GnRH, (representado con una línea azul) en donde se produce inicialmente un pico de secreción de este neuropéptido, que es seguido por un período prolongado de inhibición a tal grado, que la secreción de la GnRH se reduce por debajo del nivel basal. Este mismo efecto bifásico es observado en los niveles intracelulares de calcio, representados con la línea rosa. Asimismo, en la fase de inhibición tardía se observa una caída importante de la  $[AMPC]_i$ . En condiciones basales se observa como tanto la secreción de GnRH así como la  $[Ca^{2+}]_i$  presentan un comportamiento bifásico.

Los eventos celulares que participan en la fase inicial de activación de la secreción de la GnRH inducida por el GABA se han descrito con gran detalle. Sin embargo, aún quedan muchas incógnitas referentes a los mecanismos de señalización que participan en la fase de inhibición. Recientemente estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que la estimulación del receptor GABA<sub>A</sub> produce de forma tardía una disminución en la síntesis de AMPc a partir de los primeros dos minutos y se sostiene por al menos 30 minutos (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001). A partir de estos datos surge la hipótesis de que la disminución de la síntesis del AMPc podría resultar del incremento transitorio del nivel de calcio intracelular, ya que se ha reconocido al calcio como un importante modulador de la actividad de las adenilato ciclasas. Hasta el momento se han identificado al menos 10 isoformas de adenilato ciclasas (ACs), de las cuales 5 son sensibles a cambios en los niveles fisiológicos de calcio (Hanoune *et al.*, 1997 y Patel *et al.*, 2001). Con base en estos antecedentes surge el objetivo de este trabajo que consiste en caracterizar la expresión de las adenilato ciclasas sensibles a calcio, para identificar si estas isoformas están presentes en la línea celular inmortalizada GT<sub>1-7</sub>, y así posteriormente buscar su posible participación en el período de inhibición en respuesta a la administración del GABA.

## **ANTECEDENTES INMEDIATOS:**

### **1. CONTROL NEUROREGULATORIO DE LA REPRODUCCIÓN.**

En los mamíferos, la regulación fina de la función reproductiva es un proceso complejo de integración de señales emitidas por el hipotálamo, la adenohipófisis y las gónadas. Este eje neuroendocrino es comandado en forma descendente por la GnRH, la cual es codificada en una señal basada en su secreción pulsátil. (Ver: Martínez de la Escalera y Clapp., 2001). La GnRH se libera al sistema porta hipofisario, que está formado por dos plexos capilares unidos por vasos mayores que transportan mensajeros químicos de la base del hipotálamo a la hipófisis anterior sin diluirse en la circulación sistémica.

Cuando la GnRH alcanza sus receptores en los gonadotropos de la hipófisis, estimula la síntesis y secreción de las hormonas luteinizante (LH) y estimulante de los folículos (FSH), las cuales ejercen un papel de amplificadores de las señales centrales. Estas hormonas viajan por la circulación sistémica alcanzando a su vez a receptores específicos en las gónadas (Ver: Fink, 2000). La función primaria de la FSH en las gónadas femeninas es estimular el desarrollo de folículos y la secreción de estrógenos, mientras que la LH dispara la ovulación, favorece la formación del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona. En las gónadas masculinas, la FSH estimula la espermatogénesis, mientras que la secreción de la testosterona es estimulada por la LH (Ver: Fink, 2000).

## **2. DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LAS NEURONAS GnRHérgicas**

Las células precursoras de las neuronas GnRHérgicas hipotalámicas se diferencian tempranamente en la placa olfatoria medial. Estas neuronas continúan su diferenciación mientras migran a través del *septum nasal* y entran al mesencéfalo junto con el nervio *terminalis* que forma parte del sistema olfatorio accesorio, para llegar al área septal-preóptica y al hipotálamo (Wray *et al.*, 1989). Las neuronas GnRHérgicas forma un continuo que se extiende desde la región septal hasta el área premamilar, presentando su mayor densidad neuronal en el hipotálamo anterior, área preóptica media y el septum medial. Este grupo neuronal envía procesos axónicos hacia la eminencia media y comienza a secretar sus productos una vez que finalizan su migración hacia el cerebro anterior (Schwanzel-Fukuda, Pfaff., 1989 & Wray *et al.*, 1989). A pesar de que el ratón es el modelo que más se ha utilizado para la realización de estudios de migración y diferenciación, se ha evidenciado que lo descrito en este modelo es un fenómeno general que se presenta en otros vertebrados (Ver: Silverman *et al.*, 1994). El síndrome llamado hipogonadismo hipogonadotrópico se ocasiona porque las neuronas GnRHérgicas no migran y producen alteraciones en el desarrollo de las gónadas y en consecuencia infertilidad. Es por esta razón, que se concluyó que las neuronas GnRHérgicas que migran hasta el hipotálamo y proyectan sus axones hacia la eminencia media son las únicas que participan directamente en la función reproductiva (Schwanzel-Fukuda y Pfaff., 1989).

### **3. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LAS NEURONAS GnRHérgicas**

La distribución de las neuronas GnRHérgicas y sus proyecciones axonales en adultos han sido descritas en diversas especies. La mayor parte de estas neuronas están localizadas en la región septal, preóptica e hipotalámica, formando un continuo desde la banda diagonal de Brocca, hasta el núcleo de la estría terminalis y otras áreas diencefálicas incluyendo al núcleo periventricular, las áreas preóptica medial y lateral, así como el hipotálamo anterior y la zona retroquiasmática (Ver: Silverman., 1994). Aparte de presentar una distribución muy difusa, las neuronas GnRHérgicas conforman una población neuronal muy pequeña ya que se han reportado que en la mayoría de los mamíferos hay entre 1000-3000 neuronas GnRHérgicas (Wray *et al.*, 1989). Silverman y colaboradores en 1987 demostraron que las neuronas GnRHérgicas no conforman un grupo celular definido y que no es posible identificarlas del resto de las neuronas hipotalámicas utilizando criterios morfológicos. Asimismo, se evidenció que las neuronas GnRHérgicas proyectan sus terminales axonales hacia la eminencia media, en donde liberan al neuropéptido GnRH en la circulación porta-hipofisaria que irriga a la adenohipófisis (Silverman *et al.*, 1987). Por medio de estudios ultraestructurales se demostró que las neuronas GnRHérgicas presentan contactos sinápticos axosomáticos y axodendriticos con otras neuronas GnRHérgicas puesto que se evidenció la presencia bien definida del espacio sináptico, el agrupamiento de vesículas secretoras en la presinapsis y especializaciones membranales en los extremos pre y postsinápticos. Aparte de las interacciones sinápticas que ocurren en estas neuronas se ha demostrado que algunas neuronas están conectadas por puentes citoplasmáticos (Witkin, Silverman., 1985 & Leranth *et al.*, 1985).

### **4. LINEA CELULAR INMORTALIZADA GT1**

El estudio del sistema neuronal GnRHérgico se ha dificultado debido a sus características anatómicas, al ser una población pequeña que presenta una distribución difusa, y por lo tanto, es complicado aplicar técnicas electrofisiológicas y/o moleculares. Para tratar de resolver estas limitaciones técnicas en la década pasada la Dra Mellon y colaboradores desarrollaron una línea celular inmortalizada denominada GT1.

El abordaje utilizado consistió en inducir genéticamente la formación de un tumor de neuronas GnRHérgicas. Para este fin se construyó un gen híbrido que es la combinación de la región promotora del gen de la GnRH y la región codificante el oncogén antígeno T del virus de simio SV40. Esta construcción (denominada GnRH-Tag) se introdujo en óvulos fecundados que se obtuvieron de la cruce de las cepas de ratones CB6F<sub>1</sub>/J (C57BI/6J X BALB/cJ). Los embriones fueron implantados en una ratona pseudoembarazada y se obtuvieron 9 ratones transgénicos que fueron infértiles. Tanto en hembras como en machos se observó que las gónadas y los organos sexuales accesorios estaban sin desarrollar, sugiriendo que la construcción GnRH-Tag afecta la función reproductiva al interferir con la madurez sexual. Uno de estos ratones produjo un tumor grande localizado cerca del borde dorsal del quiasma óptico y se extendía hasta quedar debajo de la cápsula interna, desplazando la comisura anterior. Una porción del tumor fue utilizada para verificar la presencia de la construcción de GnRH-Tag y el resto del tumor se cultivó. Por la técnica de Northern blot se demostró que expresaba abundantemente ARNm correspondientes a la construcción GnRH-Tag. El tumor fue cultivado por 6 meses con la finalidad de depurar y aislar a las neuronas GnRHérgicas y por dilución seriada se obtuvieron 3 clonas denominadas GT<sub>1-1</sub>, GT<sub>1-3</sub> y GT<sub>1-7</sub>. Estas células se propagaron por 18 meses más sin cambios fenotípicos aparentes y se almacenaron en nitrógeno líquido. La velocidad de crecimiento de estas tres clonas es variable, de tal manera que las clonas GT<sub>1-3</sub> y GT<sub>1-7</sub> duplican su población en 36 horas y la clona GT<sub>1-1</sub> cada 3 o 4 días (Mellon *et al.*, 1990).

Todas las clonas derivadas del tumor GT1 muestran una morfología de tipo neuronal, puesto que presentan extensiones espontáneas de neuritas que terminan en conos de crecimiento o que hacen contacto con neuronas distantes. Al igual que las neuronas GnRHérgicas *in vivo* (Leranth *et al.*, 1985), las células GT1 hacen contactos sinápticos entre ellas (Mellon *et al.*, 1990 & Weiner RI *et al.*, 1992). También se encontró que esta línea celular expresa a la enzima glicolítica enolasa que se sintetiza exclusivamente en las neuronas, y no se detectó la expresión de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) ni componentes de la mielina, por lo tanto, se descartó que las células GT1 tengan un origen glial (Mellon *et al.*, 1990).

Otra propiedad de esta línea celular es que conservan características de neuronas secretoras puesto que los organelos asociados a la secreción como son el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso se encuentran muy desarrollados en estas células, y que se observan abundantes vesículas secretoras (Weiner *et al.*, 1992). Por otra parte, las células GT<sub>1</sub> tienen un alto grado de diferenciación, ya que expresan una amplia gama de canales iónicos membranales, que favorece la generación y propagación de potenciales de acción de manera espontánea. Entre estos canales iónicos se cuentan canales de sodio sensibles a tetrodotoxina, cuatro modalidades de canales de potasio (tres salientes y un rectificador entrante), así como canales de calcio de los tipos L y N (Bosma., 1993). Se ha demostrado tanto en neuronas GnRHérgicas en rebanadas de hipotálamo (Drouva *et al.*, 1981), así como en las células GT<sub>1</sub> (Weiner *et al.*, 1992 & Martínez de la Escalera *et al.*, 1995) que la despolarización de membrana genera la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L que induce una entrada de calcio y subsecuentemente la secreción de la GnRH. Sorprendentemente, las neuronas GT<sub>1</sub> parecen continuar con su diferenciación *in situ*, e incluso ser capaces de restaurar la función reproductiva al ser transplantadas en el cerebro de ratones hipogonádicos adultos (MacColl *et al.*, 2002).

Sin embargo, una de las características más importante de esta línea celular es que secreta a la GnRH de forma pulsátil (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992a & Krsmanovic *et al.*, 1992) con una frecuencia similar a la reportada en rebanadas de hipotálamo (Pohl *et al.*, 1982). Por lo tanto, la habilidad de generar y sincronizar pulsos de secreción de la GnRH es una propiedad intrínseca de las neuronas GnRHérgicas. En conclusión, la línea celular GT<sub>1</sub> es un modelo muy aceptado ya que facilita el entendimiento de mecanismos involucrados en la generación de pulsos de secreción y su sincronización. De igual forma, estas células son utilizadas como un modelo que permite caracterizar el efecto directo de diversos neurotransmisores sobre las neuronas GnRHérgicas y así identificar las vías de señalización que participan.

## 5. RELEVANCIA DE LA PULSATILIDAD EN LAS NEURONAS GnRHÉRGICAS.

La liberación pulsátil de la GnRH es indispensable para la función reproductiva. En estudios realizados en los años 70's por Ernest Knobil y colaboradores en monos Rhesus ovariectomizados, se describió que se presentaban oscilaciones rítmicas en la concentración de LH en plasma con una frecuencia aproximada de 1 pulso por hora (Dierschke *et al.*, 1970 & Belchetz *et al.*, 1978). Estas observaciones sugieren que el patrón oscilatorio de los niveles de la LH observado en la circulación sistémica debería ser consecuencia de una liberación intermitente de la LH por la adenohipófisis, y que estas oscilaciones a su vez eran el resultado de una señal intermitente recibida del sistema nervioso central.

En 1982, Clarke y Cummins demostraron que un incremento en la secreción de este neuropéptido en sangre portal corresponde de manera temporal a la liberación de la LH a la circulación sistémica. Por lo tanto, un método sencillo para dar seguimiento a la secreción de la GnRH, es medir de forma indirecta los niveles de la LH en sangre sistémica. El patrón de secreción pulsátil se ha descrito en un gran número de especies de vertebrados, ubicando la producción de la GnRH en la región del núcleo arcuato y el hipotálamo medio basal (Pohl *et al.*, 1982). El significado fisiológico de la pulsatilidad de la GnRH fue evidente cuando se realizaron lesiones en el hipotálamo medio basal en monos rhesus y posteriormente se trataba de reestablecer la secreción de gonadotropinas mediante la administración de agonistas de la GnRH. Por un lado, la estimulación constante de la GnRH suprimió la liberación de las gonadotropinas y subsecuentemente inhibió al eje reproductivo (Belchetz *et al.*, 1978). A pesar de que todavía no se comprende bien el fenómeno de desensibilización de los gonadotropos ante una exposición continua de la GnRH o análogos de larga duración, este fenómeno ha sido utilizado en la clínica para inhibir la secreción inapropiada de gonadotropinas, por ejemplo en la pubertad precoz. Igualmente se ha utilizado en mujeres con amenorrea hipotálmica donde es posible reestablecer la ovulación al administrar una dosis de este neuropéptido cada hora. Es importante remarcar la relevancia fisiológica de esta estimulación intermitente sobre la adenohipófisis, ya que es un fenómeno conservado en todos los vertebrados, desde los peces hasta el humano (Ver: Horchkiss, Knobil., 1994).

Por otro lado, siguiendo el mismo paradigma pero administrando de forma intermitente a la GnRH o su análogo se logra reestablecer los niveles de la LH y la FSH, hasta valores semejantes a los alcanzados antes de que se realizara la lesión (Belchetz *et al.*, 1978). Toda esta información llevó a la conclusión de que la señal intermitente de la GnRH es un componente obligatorio para el control del sistema neuroendócrino que gobierna la secreción normal de gonadotropinas y se propuso la existencia de un oscilador o “generador central de pulsos”, localizado en el hipotálamo, el cual es el responsable de la liberación rítmica de la GnRH (Ver: Hotchkiss, Knobil *et al.*, 1994). En conclusión, el buen funcionamiento de la función reproductiva depende en gran medida de la pulsatilidad de la secreción de la GnRH.

En experimentos realizados en la línea celular GT<sub>1</sub> se ha demostrado que también se presenta esta modalidad pulsátil de secreción de la GnRH con una frecuencia muy similar a la presentada en rebanadas de hipotálamo de rata hembra adulta y cultivos primarios de células hipotalámicas fetales (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992a, Krsmanovic *et al.*, 1992). Se ha propuesto que la sincronización de estas células en cultivo está dada por las uniones comunicantes, ya que este sistema neuronal forma múltiples contactos célula-célula (Weiner *et al.*, 1992) de la misma forma que se ha descrito en las neuronas GnRHérgicas *in vivo* (Leranth *et al.*, 1985). Igualmente se ha sugerido que esta ritmicidad se puede afectar por señales parácrinas, puesto que células GT<sub>1</sub> separadas físicamente, pero que comparten el mismo medio de cultivo generan una secreción de tipo pulsátil (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992a). Estas evidencias permiten inferir que la secreción de tipo pulsátil es una propiedad intrínseca del sistema neuronal GnRHérgico. Sin embargo, la modulación de la liberación de la GnRH también es influida por diversos neurotransmisores y neuromoduladores (Weiner *et al.*, 1987). A continuación se explica el efecto de los diferentes neurotransmisores sobre la secreción de la GnRH.

## 6. REGULACIÓN AFERENTE DE LA SECRECIÓN DE LA GnRH.

Si bien, la liberación pulsátil de la GnRH es una propiedad intrínseca de las neuronas GnRHérgicas (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992a), esta no es suficiente para regular la función reproductiva. La GnRH juega un papel crucial en la fisiología reproductiva y su liberación es controlada por varios neurotransmisores, incluyendo a la norepinefrina, dopamina, histamina, acetilcolina, glutamato y GABA, entre otros. El estudio del efecto de estos neurotransmisores sobre las neuronas GnRHérgicas se ha dificultado debido a que estas neuronas son escasas y presentan una distribución dispersa en el hipotálamo. Estas características anatómicas han impedido discernir si el efecto de un neurotransmisor determinado se ejerce de forma directa sobre las neuronas GnRHérgicas o bien de manera indirecta involucrando interneuronas aferentes a estas. Por otra parte, los experimentos realizados *in vivo* frecuentemente son difíciles de interpretar puesto que los resultados obtenidos son controversiales ya que dependen entre otros factores, de la especie, el estado fisiológico, la edad, y del modo de administración de los tratamientos farmacológicos. Es por esta razón, que el estudio del efecto de los diversos neurotransmisores *in vivo* se ha complementado con los resultados obtenidos *in vitro* en la línea celular GT<sub>1</sub>, lo cual permite explorar el efecto directo de cada neurotransmisor y las vías de señalización involucradas en este efecto.

Las catecolaminas centrales regulan la secreción de LH *in vivo* a través de los receptores adrenérgicos tipo  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  que facilitan o inhiben la secreción de la GnRH *in vivo* dependiendo de las condiciones fisiológicas (Etgen *et al.*, 2001). En la línea celular GT1 se evidenció que la norepinefrina y a la dopamina inducen la secreción de la GnRH a través del receptor  $\beta_1$  adrenérgico (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992b) y D<sub>1</sub> dopaminérgico (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992c) mediante estimular de forma dosis-dependiente la concentración intracelular de AMP cíclico y la secreción de la GnRH en células GT<sub>1</sub>.

Se ha mostrado que la secreción de la GnRH por catecolaminas es mediada por un incremento en los niveles de [AMPC]<sub>i</sub> que facilita la apertura de canales catiónicos operados por nucleótidos cíclicos con lo cual se despolariza la membrana plasmática y de esta manera se abren los canales de calcio sensibles a voltaje tipo L para generar la liberación de la GnRH (Vitalis *et al.*, 2000 & Kaneishi *et al.*, 2002). La histamina parece estimular centralmente la secreción de la GnRH vía la activación de receptores H<sub>1</sub>, a juzgar por estudios empleando la perfusión de explantes de hipotálamo mediobasal. Sin embargo, aunada a la incógnita sobre el posible sitio de acción de este efecto, existen algunos resultados que involucran también a receptores H<sub>2</sub>. Por ejemplo, la administración combinada de antagonistas H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, mas no la de cada uno por separado, bloquea la secreción de LH inducida por estrógenos (Kordon *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha demostrado en nuestro laboratorio que la histamina activa la liberación de GnRH mediante la estimulación de receptores tipo H<sub>1</sub> y es mediado por la vía del fosfatidil inositol (Noris *et al.*, 1995).

Además, se ha evidenciado que la serotonina y la acetilcolina son facilitadores o inhibidores de la liberación de la GnRH dependiendo del ambiente esteroideo al que estén expuestos (Kordon *et al.*, 1994). En las células GT<sub>1</sub> se ha mostrado que la serotonina induce una acción estimulante sobre la secreción de la GnRH. Sin embargo, se desconoce la vía de señalización por la cual ejerce su efecto (Hery *et al.*, 1997). Asimismo, estudios realizados en la línea celular GT<sub>1</sub> por Krsmanovic y colaboradores en 1998, demostraron que la acetilcolina ejercer un efecto bifásico que se caracteriza por una estimulación rápida de la secreción de GnRH seguida por un fase de inhibición y se ha propuesto que este efecto está mediado por la modulación de las adenilato ciclasas a través de las proteínas G<sub>i</sub>.

El glutamato se ha asociado a procesos críticos de la pubertad y la pulsatilidad de la GnRH, encontrando que este neurotransmisor y el óxido nítrico pueden ser elementos clave en la generación del pico preovulatorio de secreción de la GnRH (Terasawa E, Fernández DL, 2001). Conjuntamente, se ha reportado que tanto el glutamato como sus receptores están presentes abundantemente en varios núcleos hipotalámicos relevantes para la liberación de la GnRH (Dhandapani *et al.*, 2000).

El uso de técnicas farmacológicas ha mostrado que agonistas de glutamato estimulan la secreción de la GnRH, mientras que los antagonistas la atenúan. Dhandapani y colaboradores proponen como mecanismo que el glutamato incrementa la producción de GMP cíclico, generando la producción del óxido nítrico, y que éste a su vez estimula la secreción de la GnRH.

## 7. REGULACIÓN GABAÉRGICA DEL EJE REPRODUCTIVO

El GABA es considerado como uno de los reguladores más importantes de las neuronas GnRHérgicas, puesto que puede influir en la secreción de la GnRH (Ondo., 1974, Bergen *et al.*, 1991 & Hales *et al.*, 1994). Existen evidencias anatómicas y fisiológicas que muestran que las neuronas GnRHérgicas en roedores están inervadas por terminales GABAérgicas (Jennes, *et al.*, 1983 & Leranth *et al.*, 1985). Asimismo, se ha demostrado el efecto fisiológico del GABA en estudios realizados *in vivo*, donde se ha visto que este neurotransmisor influye en diferentes etapas de la vida. Durante la embriogénesis, el GABA tiene un efecto excitador sobre las neuronas GnRHérgicas que facilita el establecimiento del patrón espacio temporal de la migración y la actividad biosintética de las neuronas GnRHérgicas (Tobet *et al.*, 1996 & Bless *et al.*, 2000). Por otro lado, Terasawa y colaboradores evidenciaron que el GABA juega un papel muy importante en el inicio de la pubertad puesto que si se bloquea la actividad del receptor GABA<sub>A</sub> en monos Rhesus prepuberes se adelanta la pubertad por un año en comparación con los animales no tratados (Terasawa y Fernández., 2001). Se ha planteado la hipótesis de que el sistema neuronal GnRHérgico en primates esta tónicamente inhibido por el GABA hasta antes de que se presente el inicio de la pubertad (Kasuya *et al.*, 1999 & Keen *et al.*, 1999). En adultos de diversas especies se ha mostrado que el GABA actúa a través del receptor GABA<sub>A</sub> modulando la actividad pulsátil de la secreción de la GnRH *in situ* (Ondo JG., 1974, Massoto *et al.*, 1989, Donoso *et al.*, 1994 & Wuttke *et al.*, 1996).

## 7.1 Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)

El GABA se considera como el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro adulto. Hasta el momento se han identificado tres tipos de receptores al GABA en base a su farmacología y propiedades electrofisiológicas. Dos de estos, los GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> son canales permeables al ión cloro que son activados por este neurotransmisor. El tercer receptor GABAérgico, denominado GABA<sub>B</sub>, es de tipo metabotrópico puesto que es un receptor de 7 pases transmembranales que está acoplado a las proteínas G y actúa mediante segundos mensajeros y modulando la actividad de canales de potasio y de calcio (Bormann., 2000).

En mamíferos, los receptores GABA<sub>A</sub> son hetero-oligómeros ensamblados por 5 subunidades. Hasta el momento se han identificado las siguientes subunidades:  $\alpha$ (1-6),  $\beta$ (1-3),  $\delta$ (1-3),  $\gamma$ (1) y  $\epsilon$ (1). Este receptor está conformado por un largo extremo amino-terminal extracelular y 4 dominios transmembranales que incorporan un canal iónico selectivo al cloro que está constituido principalmente por la combinación de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Kardos., 1999). Dependiendo del potencial electroquímico del cloro, los receptores tipo GABA<sub>A</sub> regulan la generación de los potenciales de acción en las neuronas a través de la hiperpolarización ó despolarización de la membrana a consecuencia de la apertura de canales de cloro (Simeone *et al.*, 2002). En la mayoría de las neuronas adultas, el GABA produce una acción inhibitoria en consecuencia de la entrada de iones de cloro generando una hiperpolarización de membrana. Sin embargo, el GABA produce acción excitatoria en el hipotálamo embrionario y neonatal (Ganguly *et al.*, 2001), así como en algunas poblaciones neuronales adultas (Vardi *et al.*, 2000, Martina *et al.*, 2002 & De Jeu, Pennartz *et al.*, 2002). El receptor GABA<sub>A</sub> puede ser activado por muscimol e isoguvacina, y es bloqueado por bicuculina, picrotoxina, gabacina (SR95531) y (+) $\beta$ -hidrastina. De igual manera, este receptor está modulado alostéricamente por barbituratos benzodiazepinas, etanol y esteroides (Bormann., 2000).

Por otro lado, el receptor GABA<sub>B</sub> se identificó al observar una respuesta inhibitoria retardada de la acción del GABA. El efecto inhibitor del receptor GABA<sub>B</sub> es generado por la activación de las proteínas G que actúan a través de segundos mensajeros, y que influyen sobre la actividad de los canales rectificadores entrantes de potasio y sobre la actividad de canales de calcio dependientes de voltaje (Hammond., 2001). Se ha evidenciado que este receptor tiene similitudes estructurales con el receptor metabotrópico de glutamato puesto que ambos receptores están acoplados a las proteínas G (Billinton *et al.*, 2001). El receptor GABA<sub>B</sub> es un heterodímero que puede estar constituido por la combinación de las subunidades: GABA<sub>B(1a)</sub>, GABA<sub>B(1b)</sub> y GABA<sub>B(2)</sub> (Hammond., 2001). El receptor GABA<sub>B</sub> es activado por el baclofen y el ácido fosfínico (SKF 97541), y son bloqueados por el faclofen, el saclofen y el CGP64213 (Chebib y Jonhston., 1999 & Bormann., 2000).

Recientemente se ha descrito un tercer subtipo de receptor denominado GABA<sub>C</sub> que al igual que el receptor GABA<sub>A</sub> es de tipo ionotrópico, pero que presenta una estructura distinta. Hasta el momento se han identificado 3 subunidades del receptor GABA<sub>C</sub> ( $\rho_{1-3}$ ) que son ensambladas en homooligómeros o pseudooligómeros ( $\rho_{1-2}$ ) (Chebib y Jonhston., 1999). Los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> presentan alta selectividad por el cloro y un tamaño de poro similar. Sin embargo, el receptor GABA<sub>C</sub> es alrededor de 10 veces más sensible al GABA que el receptor GABA<sub>A</sub> y presenta una débil desensibilización, aún frente a altas concentraciones del agonista (Bormann., 2000). El receptor GABA<sub>C</sub> receptor es selectivamente activado por el análogo del GABA ácido *cis*-4-aminocrotónico (CACA) y es bloqueado por la picrotoxina (Chebib y Jonhston., 1999). Esta molécula se ha identificado en las células bipolares de la retina al presentarse corrientes rápidas de cloro relacionadas a GABA y que son insensibles a bicuculina o baclofen (Feigenspan., 1998).

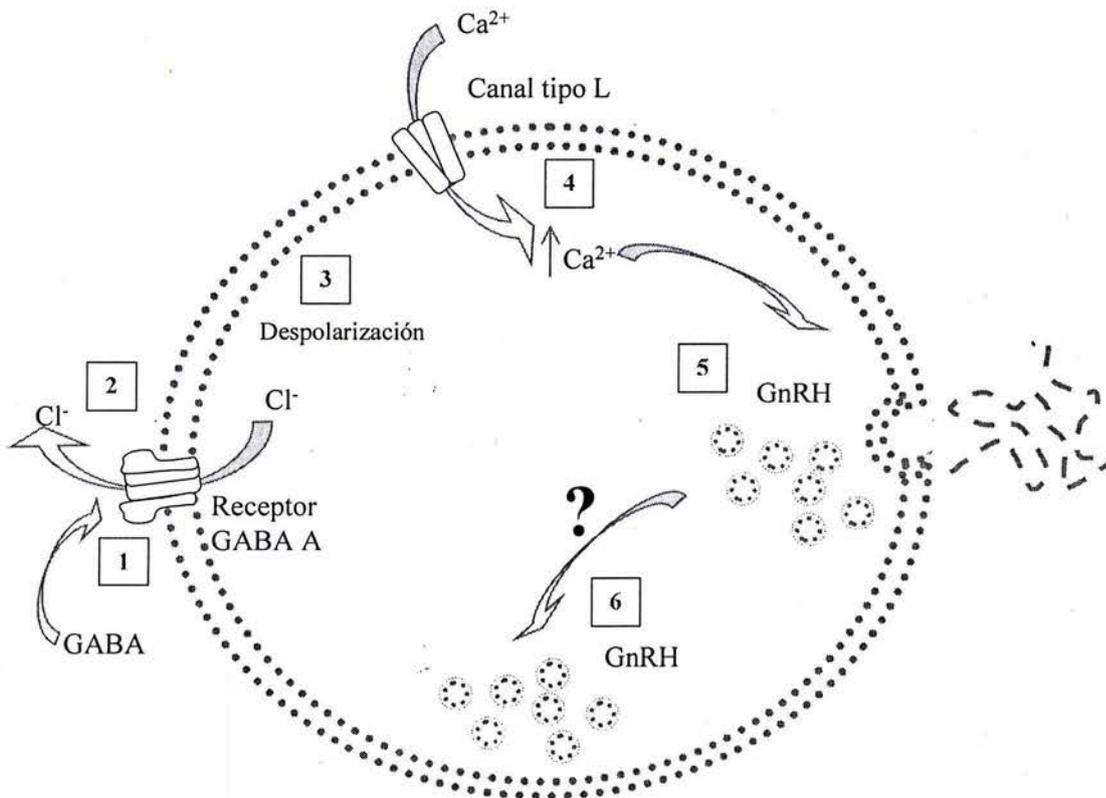
## **8. ACCIÓN DEL GABA EN LA LÍNEA CELULAR GT1.**

El desarrollo de la línea celular inmortalizada GT<sub>1</sub> permitió estudiar el efecto directo de diversos neurotransmisores sobre la secreción de la GnRH y por ende, profundizar sobre las vías de señalización involucradas.

El GABA fue uno de los primeros neurotransmisores en ser analizado en las células GT<sub>1</sub>, encontrándose receptores GABA tipo A funcionales. Se demostró por la técnica de PCR que estas células expresaban al ARNm de las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_3$  correspondientes al receptor GABA tipo A (Hales *et al.*, 1992). A pesar de que solamente se expresan las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , esto es suficiente para conformar un canal de cloro funcional, debido a que el GABA evoca corrientes de cloro (Hales *et al.*, 1992, Hales *et al.*, 1994 & Javors *et al.*, 1998) y la liberación de la GnRH (Favit *et al.*, 1992 & Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). Asimismo, el [<sup>3</sup>H] muscimol se une a las membranas aisladas de las células GT<sub>1-7</sub> (Hales *et al.*, 1992 & Favit *et al.*, 1993). En las neuronas GnRHérgicas *in vivo*, también se demostró la presencia de receptores GABA funcionales que estaban compuestos por subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_3$  y  $\gamma_2$ . No obstante, únicamente el 15% de las neuronas en estudio expresaban niveles detectables de la subunidad  $\gamma_2$  (Jung *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha descrito que las células GT<sub>1</sub> no expresan la subunidad  $\gamma_2$ , lo cual implica que este receptor es insensible a las benzodiazepinas y el etanol. Sin embargo, se ha encontrado que las células GT<sub>1-7</sub> responden a dosis altas de etanol, (172-344 mM) potenciando las corrientes evocadas por el GABA, lo cual sugiere la presencia funcional de la subunidad  $\gamma_2$  (Hales *et al.*, 1992). Es posible que no se haya detectado esta subunidad debido a que se presenta un porcentaje muy bajo de expresión por célula o que esta subunidad se exprese solamente en una subpoblación pequeña de estas células.

Posteriormente, se demostró que el GABA produce un efecto bifásico sobre la secreción de GnRH en la línea celular GT<sub>1</sub> (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). Inicialmente se presenta una fase de activación mediada por receptores tipo GABA<sub>A</sub> (Hales *et al.*, 1994 & Martínez de la Escalera *et al.*, 1994), con lo que se produce una salida de iones cloro debido a que el potencial de equilibrio electroquímico de este ión es mayor que el potencial de reposo de membrana en esta línea celular (Hales *et al.*, 1992 & Javors *et al.*, 1998) generando una despolarización de la membrana y la activación de los canales de calcio dependientes del voltaje (Hales *et al.*, 1994) y consecuentemente, un incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Hales *et al.*, 1994 y Spergel *et al.*, 1995).

Este aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  produce un episodio único de secreción de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). Posteriormente, se genera una caída en la secreción de la GnRH y de la  $[Ca^{2+}]_i$  por niveles debajo del basal que perdura por más de una hora y en ambos parámetros se pierde su comportamiento oscilatorio característico (Charles y Hales, 1995 & Sun *et al.*, 1997). Recientemente en nuestro laboratorio se reportó que el receptor tipo  $GABA_A$  induce la disminución de los niveles de calcio y AMPc intracelular, lo cual podría estar asociado al establecimiento del efecto inhibitorio sostenido de la secreción de la GnRH (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001). Se descartó que el receptor del  $GABA_B$  estuviese acoplado a la vía de la adenilato ciclasa o de la modulación del calcio, puesto que el agonista baclofen no tuvo efecto sobre los niveles intracelulares del AMPc y el calcio (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001). En la figura 1 se muestra una representación esquemática de la información conocida hasta el momento de la fase transitoria de activación.



**Figura 2.** El efecto del GABA en las células GT<sub>1-7</sub>. El GABA estimula al receptor tipo  $GABA_A$  1) que es un canal iónico que permite una corriente saliente de cloro 2) provocando una despolarización de la membrana plasmática 3). En consecuencia, se abren los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje, permitiendo la entrada de calcio a la célula 4). El incremento de calcio intracelular produce la liberación de la GnRH, 5) que es seguida por un período prolongado de inhibición de la secreción de la GnRH del cual se desconocen los mecanismos de acción participan 6).

## 9. VIAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA SECRECIÓN DE LA GnRH.

A fin de comprender mejor la síntesis y secreción de la GnRH se requiere profundizar sobre los mecanismos celulares que residen en este sistema neuronal. Puesto que estamos estudiando un efecto que se presenta con un curso temporal de varios minutos, es de esperar que involucre la participación de segundos mensajeros.

### 9.1 GENERALIDADES DEL CALCIO

El ión calcio es de gran importancia fisiológica en la coordinación de un amplio intervalo de procesos celulares. Entre estos está la liberación de neurotransmisores, la activación de canales iónicos en la membrana celular y la regulación de un gran número de enzimas citoplasmáticas (Ver: Nicholls *et al.*, 2001). Por consiguiente, la actividad celular se puede regular directa o indirectamente por el calcio. Muchos tipos de células excitables y no excitables muestran oscilaciones periódicas de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Las neuronas utilizan el calcio en el control del crecimiento celular y la diferenciación, el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto, y la excitabilidad de la membrana, así como la exocitosis y la actividad sináptica (Ver: Purves., 2001) entre muchas otras funciones. En neuronas no despolarizadas la concentración de calcio intracelular libre ( $[Ca^{2+}]_i$ ) es de aproximadamente 100 nM, mientras que la concentración de calcio en el espacio extracelular es aproximadamente 2 mM. Este gradiente en los niveles del calcio se mantiene por la interacción de cuatro fenómenos: El influjo, el amortiguamiento por proteínas, almacenamiento en depósitos intracelulares y salida activa de calcio libre al espacio extracelular (Ver: Clapham., 1995 & Purves., 2001).

El influjo del calcio a la célula ocurre a través de los canales de calcio dependientes del voltaje (CCDV) que se encuentran en la membrana plasmática de células musculares, neuronas y células gliales (Ver: Hoth., 1998). Estos canales regulan la entrada del calcio al citoplasma, mediando funciones fisiológicas tales como la regulación enzimática, la salida de neurotransmisores de las terminales nerviosas y la expresión génica entre otras.

Los CCDV se clasifican según sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas en tipos L, T, N, P/Q y R (Ver: Nicholls *et al.*, 2001). El calcio se almacena dentro de pozas intracelulares y se libera al citoplasma principalmente a través de la activación de los receptores 1, 4, 5 fosfatidil inositol (IP<sub>3</sub>) y los receptores a rianodina (RYD) (Clapham DE. 1995).

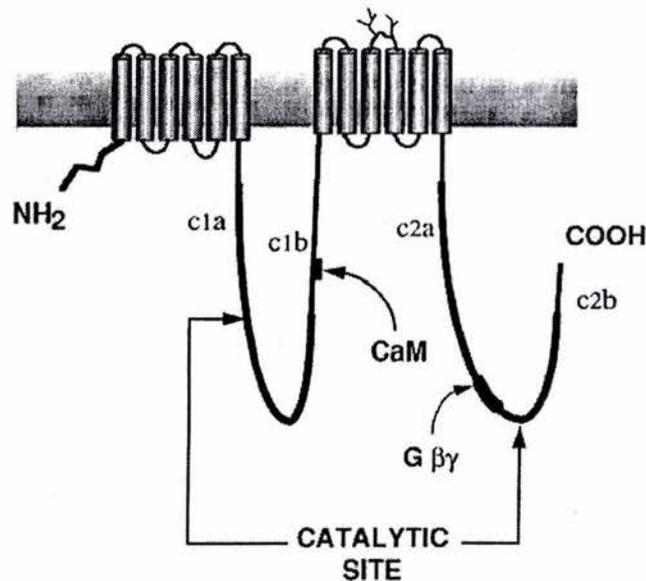
En las células existen mecanismos de secuestro de calcio libre intracelular en las pozas intracelulares como el retículo endoplasmático o sarcoplásmico, las mitocondrias y las vesículas sinápticas (Ver: Hoth., 1998). Además, el nivel basal del calcio intracelular se mantiene gracias a la acción de proteínas capaces de unir calcio libre como la calmodulina, calbindina y parvalbúmina entre otras. La capacidad de amortiguación de las proteínas es limitada. Existen diversos mecanismos que permiten transportar el calcio del citosol hacia el medio extracelular con el fin de mantener los niveles de calcio en el rango nanomolar. Dentro de estos mecanismos se encuentra el intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> y las bombas de calcio dependientes de ATP, las cuales sacan calcio de la célula o lo almacenan en compartimentos intracelulares como el retículo endoplásmico liso (Clapham DE. 1995).

## 9.2 ACCIÓN DEL CALCIO EN LA LÍNEA CÉLULAR GT1

En la línea celular GT<sub>1.7</sub> se ha reportado la generación de oscilaciones espontáneas en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y que existe una sincronización entre estas células (Núñez *et al.*, 2000 & Charles y Hales, 1995). Por otro lado, se identificó que la entrada de calcio en estas células estaba mediada por canales de calcio dependientes del voltaje tipo L (Charles y Hales, 1995 & Sun *et al.*, 1997). Se descartó que las variaciones en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se debiera a movilización de calcio de las pozas intracelulares (Charles y Hales, 1995). Recientemente se ha reportado que existe una relación entre la secreción pulsátil de la GnRH y la dinámica del calcio intracelular. Sin embargo, es posible que las oscilaciones de calcio sean necesarias pero no suficientes para que se induzca la liberación de la GnRH (Núñez *et al.*, 2000). El efecto que produce el calcio *per se*, puede estar asociado a otras vías de señalización, por ejemplo modulando a la vía de la adenilato ciclasa (Cooper *et al.*, 1995 & Chaberdès *et al.*, 1999).

### 9.3 GENERALIDADES DEL AMPc Y LA ADENILATO CICLASA

El AMP cíclico (AMPc) se sintetiza a partir del ATP por enzimas denominadas adenilato ciclasas (ACs). Estas enzimas remueven dos grupos fosfatos (pirofosfato) y producen un AMP con estructura cíclica. Cuando se eleva la concentración de AMPc intracelular, se activa a una cinasa de proteínas denominada A (PKA). Esta enzima media muchas funciones fisiológicas a través de la fosforilación de proteínas. Además, puede unirse a ciertos canales iónicos influenciando la señalización neuronal. La conversión de AMPc en AMP por medio de la acción de una enzima que rompe el enlace fosfodiéster (llamada genéricamente fosfodiesterasa) desactiva al AMPc (Tang, Hurley., 1998). Se han identificado al menos 9 genes que codifican para ACs adosadas a la membrana plasmática (AC I-IX), y un gen que codifica para una isoforma denominada AC X (Cooper DMF., 2003). Las ACs que son proteínas integrales de membrana tienen una masa molecular aproximada de 120-150 KDa y una estructura compuesta por 12 segmentos de pases transmembranales (Figura 3). La AC presenta una estructura que consta de un extremo corto amino terminal, dos segmentos de 6 pases transmembranales (M1, M2) separados por un asa citoplasmática larga (C1) y por último, un extremo amino terminal que conforma una segunda asa citoplasmática larga (C2) (Hanoune *et al.*, 1997 & Sunahara, Taussig., 2002).



**Figura 3.** Estructura molecular de las adenilato ciclasas de mamíferos. Se muestra la estructura de la AC, que consiste en un extremo amino terminal corto que es seguido por 2 dominios de 6 pases transmembranales, intercalados por dos asas citosólicas largas (C1 y C2). (Tomado de Hanoune, 1997)

El sitio catalítico de la AC esta constituido por los dominios C1a y C2a que interactúan entre ellos formando una estructura antiparalela pseudosimétrica. La región catalítica esta altamente conservada entre las ACs de mamíferos presentándose una identidad de 50-70% (Tesmer *et al.*, 1997). No obstante, las regiones C1b y C2b son las regiones menos conservadas. Igualmente, no hay homología entre los dominios transmembranales de las diferentes isoformas, excepto por el hecho de que presentan secuencias cortas (20-25 aa) ricas en residuos hidrofóbicos (Tang, Hurley., 1998). Existe un mayor porcentaje de identidad de la misma isoforma comparada entre 2 especies (por encima del 80%) que entre dos isoformas distintas comparadas en la misma especie (aproximadamente del 30%) (Hanoune *et al.*, 1997). Estudios de localización cromosomal de las ACs en humanos y en ratón muestran que cada isoforma esta codificada por un gen localizado en un cromosoma diferente y además es controlado por una región promotora específica para cada isoforma. La comparación de secuencias entre las ACs elimina la posibilidad de que se generen de un mismo gen a través de un splicing alternativo (Hanoune *et al.*, 1997).

Las ACs son activadas por forskolina (con excepción de la AC IX) y por GppNHp. Asimismo, esta enzimas son inhibidas por análogos de la adenosina, denominados inhibidores del sitio P, como la 2' dideoxi-3-AMP (Tang, Hurley., 1998). Las ACs difieren considerablemente en sus propiedades de regulación y se agrupan en función de su regulación en: Grupo 1 (AC I y VIII) que son sensibles al complejo calcio-calmodulina; Grupo 2 (AC II, IV y VII), que se activan tanto por las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína G, como por fosforilación mediada por la PKC; Grupo 3 (AC V y VI), que se inhiben por concentraciones fisiológicas de calcio citosólico libre; Grupo 4 (AC IX), que es insensible a la forskolina, y Grupo V que es la AC soluble (AC X). Estos últimos 2 grupos se desconoce sus mecanismos de regulación (Hanoune *et al.*, 1997 y Patel *et al.*, 2001). En la tabla 1 se resume las características más relevante de las isoformas de las AC, incluyendo la localización cromosomal, su distribución en los tejidos y sus mecanismos de regulación.

Isoforma de la AC	Localización cromosomal	Distribución en los tejidos	Proteínas G	Cinasas	Efectos del calcio
AC I	7p12	Cerebro, Médula adrenal	G $\alpha_s$ estimula G $\beta\gamma$ inhibe G $\alpha_o$ inhibe	PKC: estimula débilmente CamKIV: Inhibe	Ca <sup>2+</sup> -CaM estimula
AC II	5p15	Cerebro, pulmón, corazón y músculo esquelético	G $\alpha_s$ estimula G $\beta\gamma$ estimula	PKC: estimula	
AC III	2p22-p24	Cerebro y epitelio olfatorio	G $\alpha_s$ estimula	PKC: estimula débilmente CamKII: Inhibe	Efecto dual
AC IV	14q11.2	Cerebro, corazón, riñón, hígado, útero y TAC <sup>a</sup>	G $\alpha_s$ estimula G $\beta\gamma$ estimula	PKC: Inhibe	
AC V	3q13.2-q21	Cerebro, corazón, riñón, hígado, útero, TAC <sup>a</sup> y adrenales	G $\alpha_s$ estimula G $\beta\gamma$ inhibe G $\alpha_i$ inhibe	PKA: Inhibe PKC $\alpha,\xi$ : Estimula	Inhibe
AC VI	12q12-q13	Ubicuo	G $\alpha_s$ estimula G $\beta\gamma$ inhibe G $\alpha_i$ inhibe	PKA: Inhibe PKC: Inhibe	Inhibe
AC VII	16q12-q13	Ubicuo, altamente expresado en cerebro	G $\alpha_s$ estimula G $\beta\gamma$ estimula	PKC: Estimula	
AC VIII	8q24	Cerebro, pulmón, corazón, testículo, útero, adrenales	G $\alpha_s$ estimula		Ca <sup>2+</sup> -CaM estimula
AC IX	16p13.3	Cerebro y músculo esquelético	G $\alpha_s$ estimula		
AC X	1q24	Testículo	Sin efecto		

**Tabla 1.** Propiedades de las ACs de mamíferos. En esta tabla se muestra la localización cromosomal de cada isoforma de la AC en humanos, su distribución en los tejidos y mecanismos de regulación. (Tomado de Sunahara y Tausing., 2003)

<sup>a</sup> TAC, tejido adiposo café

#### 9.4 ACCIÓN DEL AMPc EN LAS CÉLULAS GT1

La secreción de la GnRH en las células GT<sub>1</sub> se estimula por incrementos en la [AMPc]<sub>i</sub> (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992b, 1992c y 1995). En las células GT<sub>1</sub>, los tratamientos de dopamina y noradrenalina indujeron la producción del AMPc y posteriormente, la liberación de la GnRH de manera dosis-dependiente (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992b y 1992c).

Los efectos de la noradrenalina y la dopamina son mimetizados farmacológicamente por análogos de AMPc (e.g., 8-Br-AMPc), así como por activadores de las adenilato ciclasas (e.g., forskolina) generando un incremento significativo de la secreción de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1995). Se ha propuesto que el efecto estimulador del incremento en la  $[AMPc]_i$  puede ser mediado por los canales catiónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (CDN). Se ha descrito que los canales CDN se expresan en las células GT1 y que presentan propiedades electrofisiológicas similares a las descritas en las neuronas olfatorias (Vitalis *et al.*, 2000). Los canales CDN parecen jugar un papel muy importante en la regulación de la excitabilidad celular en las células GT1, puesto que la elevación de la  $[AMPc]_i$  incrementa las oscilaciones del calcio (Constantin y Charles., 1999). Más aún, el bloqueo de los canales CDN con L-cis-diltiazem previene la estimulación de las oscilaciones del calcio por incrementos en la  $[AMPc]_i$  (Kaneishi *et al.*, 2002). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la disminución en la concentración de este segundo mensajero reduce la secreción pulsátil de la liberación de la GnRH (Paruthiyil S *et al.*, 2002 & Yoshida *et al.*, 2003).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

Este proyecto surgió a partir del interés de nuestro laboratorio por tratar de explicar el mecanismo molecular que induce el GABA sobre la secreción de la GnRH. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio utilizando como modelo a las células GT<sub>1-1</sub>, se encontró que el GABA genera un efecto dual en la secreción de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994), que es mediado por la activación del receptor del GABA<sub>A</sub> (Hales *et al.*, 1992, Martínez de la Escalera *et al.*, 1994, Sun *et al.*, 1997 y Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001). De forma temprana el GABA produce un incremento rápido que ha sido explicada por una despolarización de la membrana y en consecuencia, la activación de los CCDV tipo L (Hales *et al.*, 1994 y Spergel *et al.*, 1995). Este incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  genera la liberación de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). Si bien, parece claro cual es el mecanismo de acción del efecto temprano del GABA, aún no se comprende como es que el GABA produce este efecto tardío y sostenido de inhibición de la secreción de la GnRH.

Esta fase prolongada (por varios minutos) de inhibición tanto de la secreción de la GnRH como de la  $[Ca^{2+}]_i$  que se caracteriza por una disminución hasta alcanzar niveles por debajo del basal (Charles y Hales, 1995 y Sun *et al.*, 1997) y la ausencia de oscilaciones en ambos parámetros. Asimismo, ha sido demostrado que células  $GT_{1-7}$  expuestas al GABA, presentan una disminución dosis-dependiente de la  $[AMPC]_i$  y un decremento en la excitabilidad (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001). De la misma forma, se mostró que estos efectos del GABA son mimetizados por muscimol (agonista del receptor  $GABA_A$ ), bloqueados por bicuculina y picrotoxina (antagonistas del receptor  $GABA_A$ ) y el baclofen no afecta la  $[AMPC]_i$ . Además, los receptores  $GABA_B$  no están relacionados con la inhibición de la vía del AMPc (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001) ni con la modulación del calcio (Hales., 1994 y Sun *et al.*, 1997) en las células  $GT_1$ . Con base en estos datos, proponemos que la activación del receptor  $GABA_A$  podría actuar a largo plazo de forma metabotrópica al modular la formación de AMPc. Otro dato importante, es que esta serie experimental para identificar el efecto del GABA sobre la  $[AMPC]_i$  fue realizada en presencia del inhibidor de fosfodiesterasas (3-isobutil-1-metilxantina), por lo tanto, es sugerente de que el decremento en la  $[AMPC]_i$  es mediado por la caída en la actividad de las ACs más que por la degradación producida por las fosfodiesterasas.

En conclusión, dado que la caída en la  $[AMPC]_i$  es mediada por el receptor  $GABA_A$  y a que se conoce que las ACs son moduladas por incrementos fisiológicos en la concentración intracelular, nosotros nos preguntamos si sería posible que el incremento temprano en la concentración intracelular del calcio deprima de forma sostenida la actividad de las adenilato ciclasas y que esto a su vez, explique la disminución en la  $[AMPC]_i$ . Esto sugiere la unión de dos importantes vías de señalización con un profundo significado fisiológico, tal como se ha demostrado en tejido cardiaco (Yu *et al.*, 1993, Cooper *et al.*, 1995 y Kimura *et al.*, 2000). Para responder esta pregunta, al menos de forma indirecta, nos propusimos investigar si se encuentran presentes las isoformas de la AC que son reguladas por calcio, debido a que hasta la fecha, no se ha caracterizado la expresión de todas las adenilato ciclasas sensibles a calcio en la línea celular  $GT_1$ . Así nuestra hipótesis es la siguiente:

## **HIPÓTESIS**

*La línea celular inmortalizada GT<sub>1-7</sub> expresa predominantemente a las adenilato ciclasas inhibibles por incrementos de calcio intracelular (AC V y VI).*

Esta hipótesis particular se desprende de la hipótesis del grupo de trabajo en la cual se postula que:

*La línea celular inmortalizada GT<sub>1-7</sub> expresa predominantemente a las adenilato ciclasas inhibibles por incrementos de calcio intracelular (AC V y VI), por lo que la fase inhibidora generada por la administración del GABA a las células GT<sub>1-7</sub> se debe a que la elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  desactiva a las adenilato ciclasas V y VI, lo cual provoca una disminución en la  $[AMPc]_i$ , responsable en última instancia del cese de las oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la secreción de la GnRH.*

## **OBJETIVOS:**

Nos hemos planteado como objetivos:

- 1) Identificar la expresión de las adenilato ciclasas sensibles a calcio tipo I, III, V, VI y VIII, en las células GT<sub>1-7</sub>.
- 2) Realizar la estandarización de la técnica de PCR cuantitativo
- 3) Determinar por PCR cuantitativa la abundancia relativa de sus mensajeros.

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL:

### 1) CULTIVOS DE CÉLULAS GT1

Las células GT<sub>1-7</sub> se cultivaron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro (Costar Corporation, Cambridge, MA), en medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (todos de GIBCO). Los cultivos se mantuvieron dentro de un incubador a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada tres días y se subcultivaron hasta que se acumulaban aproximadamente 5 X 10<sup>6</sup> células. Esto se realizó disociándolas con tripsina al 0.05% y EDTA a concentración 4N en solución salina balanceada, se centrifugaron a 1000 rpm por un tiempo de 5 minutos en una centrífuga clínica, y finalmente se resuspendieron y sembraron.

### 2) DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Se realizó una búsqueda por computadora en el *genBank* para localizar la secuencia completa de cada isoforma de adenilato ciclasa. Posteriormente se delimitó la secuencia única de cada isoforma por medio de comparaciones entre isoformas. Dicha secuencia se utilizó para diseñar el par de oligonucleótidos apropiado mediante el programa *Primer picker* disponible en <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>.

Para este objetivo se tomaron en cuenta los siguientes criterios: 1) La extensión del oligonucleótido entre 18 y 24 bases. 2) Una proporción de guanina y citosina entre 40 y 60%. 3) La temperatura de hibridación entre 58 y 65°C y 4) La extensión del producto de PCR no mayor de 500pb. El programa seleccionó oligonucleótidos que no presentaron estructuras secundarias, palíndromes o formación de dímeros entre ellos. Finalmente se realizó una segunda búsqueda con el programa *Blast* disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> para verificar que el oligonucleótido diseñado no tuviera similitud con otra isoforma de la adenilato ciclasa para ratón.

Mediante una PCR de gradiente de temperatura se determinó el intervalo de temperatura óptima de hibridación ( $T_m$ ) para cada juego de oligonucleótidos. Este procedimiento consiste en preparar una mezcla de reacción para PCR con el par de oligonucleótidos a analizar y a cada tubo se le somete a una temperatura de hibridación distinta, variando la  $T_m$  en un rango que abarca de 53.2 a 67.5°C. Los productos del gradiente de temperatura fueron analizados en un gel de agarosa al 1.2% para observar la amplificación teñida con bromuro de etidio.

### 3) EXTRACCIÓN DE ARN.

El ARN total se aisló de acuerdo al método previamente descrito por Chomczynsky y Sacchi en 1987. La muestra se desnaturalizó con tiocianato de guanidina, sarcosinato lauril de sodio al 5% (SDS), 0.1 M de  $\beta$ -mercaptoetanol y 25 mM de citrato de sodio a un pH de 7. El lisado se extrajo con fenol/cloroformo. La fase acuosa se precipitó con alcohol 2-isopropílico y se reprecipitó adicionándole nuevamente alcohol 2-isopropílico. Se lavó con alcohol etílico al 70%. Por último se decantó y resuspendió con agua libre de ARNasas y se le adicionó un inhibidor de ARNasas. La cantidad de ARN obtenida se cuantificó midiendo su absorbancia a 260nm (Beckman DU 650), y se verificó la integridad de la molécula analizando la muestra en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio.

### 4) RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) Y AMPLIFICACIÓN (PCR)

Se utilizaron 5  $\mu$ g de ARN y se les añadió buffer de retrotranscripción, nucleótidos oligo dT (Biolabs), una mezcla de desoxinucleótidos (4mM) y la enzima transcriptasa reversa de *Malone mammalian leucemia virus* (TRMMLV, Promega). La reacción se incubó durante 1 hora a 37°C y posteriormente a 95°C durante 5 minutos. El ADN complementario (ADNc) obtenido se congeló a -20°C. El ADNc, se amplificó mediante PCR utilizando la siguiente mezcla de reacción: mezcla de desoxinucleótidos (4mM), buffer de reacción, MgCl (1.5mM), ADNc complementario, la mezcla de oligonucleótidos específicos (4mM) y la enzima Taq polimerasa (1 Unidad).

En la siguiente tabla se muestra cada isoforma de la adenilato ciclasa con su correspondiente secuencia de oligonucleótidos y el tamaño esperado del producto de amplificación.

<b>Adenilato ciclasa I</b>	Extremo 5'	CCA TGA GAG GAA CAC CTT TCT
Producto de 597 pb	Extremo 3'	GTG ATG TGC AGG TAC AGG GTA
<b>Adenilato ciclasa I</b>	Extremo 5'	GGC CGA TCT GAA CTT CTT TAC
Producto de 160 pb	Extremo 3'	CAC ACT CTG TGG GAT TAC CAG
<b>Adenilato ciclasa III</b>	Extremo 5'	ACT CGG TGG AGA AGGAGA AG
Producto de 480 pb	Extremo 3'	TAC AGG TTG AGG GCA GTC AC
<b>Adenilato ciclasa V</b>	Extremo 5'	AGG TAG TGG GCC TGT TGC T
Producto de 187 pb	Extremo 3'	CTG AAA CTG GTC TGG GAG TTG
<b>Adenilato ciclasa VI</b>	Extremo 5'	GTT CCC ATA CTC CAC CCT GAT
Producto de 219 pb	Extremo 3'	ACA CAA GCAGAACCG AGAAGA
<b>Adenilato ciclasa VIII</b>	Extremo 5'	ACT TGG TCT GTG CAT TTA TCG
Producto de 500 pb	Extremo 3'	AAA GAG ACC TGC GTA GAT GGT

**Tabla 2.** Se muestra tanto la secuencia de los oligonucleótidos de cada isoforma así como el tamaño esperado de cada fragmento.

Las condiciones de la reacción de la PCR para la amplificación de las adenilato ciclasas se establecieron previamente utilizando un gradiente de temperatura empleando el termociclador *Mastercycler gradient (Eppendorf)*. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción utilizando cada par de oligonucleótidos bajo las siguientes condiciones: se desnaturalizó la muestra a 94°C por 150 segundos, se realizaron 35 ciclos con los siguientes parámetros: incubación por 30 segundos a 94°C, seguido de 30 segundos a la temperatura de hibridación ( $T_m$ ) apropiada dependiendo del par de oligonucleótidos y por último, 30 segundos de incubación a 72°C. Finalmente se incubó a 72°C por 7 minutos. Tanto para la retrotranscripción como para la PCR se utilizó el termociclador *Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer)*. Los productos se analizaron en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio.

## 5) CLONACIÓN DE FRAGMENTOS GENÓMICOS DE LAS ADENILATO CICLASAS

Mediante la técnica de PCR se obtuvieron fragmentos genómicos de las isoformas de interés. Cada fragmento se ligó en el vector pGEM (Promega) utilizado para transformar bacterias competentes mediante un choque térmico. Las bacterias que expresan el vector con el fragmento insertado se identifican por sus características de resistencia a la ampicilina y porque interrumpen el gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Una vez obtenidas las colonias se verificó la presencia del fragmento mediante PCR. Cada colonia identificada fue lisada y se extrajo el vector con su fragmento de ADN insertado. El cual fue utilizado para realizar las curvas de calibración para la técnica de PCR cuantitativo y secuenciación.

## 6) PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL:

Para cuantificar la expresión de las isoformas de la adenilato ciclasa se utilizó el equipo de PCR en tiempo real *LightCycler™* (Roche) y el software *LightCycler™* en la versión 3.5. Las mediciones se realizaron mediante el registro de la fluorescencia generada por el reactivo fluorescente *SYBR Green® I* (Qiagen) que se integra entre las cadenas de ADN sintetizado durante la amplificación.

Este sistema funciona con un volumen muy pequeño de muestra que es colocado en capilares y su temperatura es controlada con aire caliente y a temperatura ambiente con lo cual se facilita que los cambios de temperatura alcancen una rapidez de hasta 20°C por segundo. La reacción de PCR puede describirse como una fase inicial de ruido que es seguida por un crecimiento exponencial del producto de amplificación o fase logarítmica que empieza cuando se acumuló suficiente producto como para ser detectado y finalmente se produce una curva asintótica. La cuantificación del producto se realiza en la fase final de crecimiento exponencial que presenta una relación inversa puesto que a mayor cantidad de copias de ADN o producto de amplificación, menor número de ciclos se requieren para que se alcance un nivel amplificación determinado.

Para construir la curva de estandarización, se determina el número de ciclos que requirió cada estándar para alcanzar un nivel de fluorescencia que teóricamente representa la misma cantidad de producto de la PCR en todas las diluciones. Con esta información se construye una curva de estandarización mediante una regresión lineal. Para todas las curvas de estandarización se utilizó el método de análisis de segunda derivada que tienen la ventaja de tener un alto grado de reproducibilidad y de que los datos son calculados de manera automática, sin influencia del usuario. Además no interviene el ruido de fondo presente en el inicio de la amplificación y el ajuste de la línea base se realiza de forma aritmética, de manera que a cada estándar se le resta el promedio de las mediciones más bajas. También tiene la ventaja de poderse determinar la temperatura de disociación, la cual nos indica la presencia de formación de dímeros, productos inespecíficos o mutaciones. Esto es posible debido a que entre productos de amplificación distintos existen diferencias en el tamaño y la complejidad de la molécula (Ver en: Manual operación del *Light cycler*).

Para crear la curva de estandarización se empleó el producto de PCR clonado en un vector, tal como se describió previamente. Se cuantificó la clona obtenida por medio de espectrofotometría y mediante el siguiente cálculo matemático se hizo una estimación de la cantidad de copias presentes con el fin de realizar diluciones seriadas que permitieran construir una curva de estandarización para referir el número de copias de ARNm por reacción.

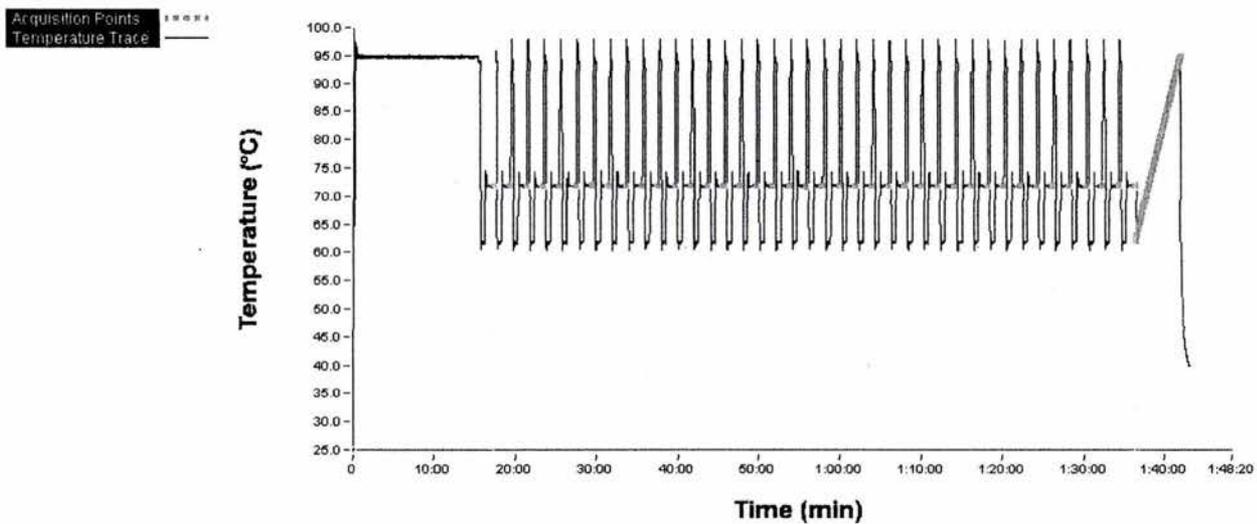
$$\text{Copias } /\mu\text{L} = \frac{\text{Masa del DNA en g}/\mu\text{L}}{(\text{Tamaño del vector en pb} + \text{Tamaño inserto en pb})(660)} \times 6.022 \times 10^{23}$$

En esta fórmula se calcula el número de copias por  $\mu\text{L}$  de producto clonado. Para este fin, se divide la masa del plasmido entre el total obtenido de la suma de pares de bases (pb) del vector y el fragmento insertado multiplicado por el peso aproximado de una base. El total de este cálculo es multiplicado por el número de avogadro.

Se estandarizaron las condiciones necesarias para la realización de la PCR cuantitativa, basándose en las condiciones que se determinaron previamente utilizando a la PCR convencional y en las correcciones sugeridas en el manual del equipo. Finalmente se programaron las condiciones en que se llevó a cabo la reacción. De tal manera que se inicia con un período de incubación de 15 minutos a 95°C, en el cual se activa a la enzima, sin que se realice ningún tipo de medición. Posteriormente, se programaron 40 ciclos que consistieron en: 1) 20 segundos de desnaturalización a 94°C, 2) 30 segundos de hibridación utilizando la temperatura recomendable para cada par de oligonucleótidos y 3) 50 segundos de extensión a 72°C. Al final de cada ciclo el equipo realizó una medición única del fluoroforo *SYBR Green® I*.

Por último se realizó una curva de disociación la cual consiste en realizar una medición continua cada 0.1°C iniciando a los 65°C y finalizando a los 95°C. El propósito de esta curva de disociación es determinar la temperatura a la cual se separa el 50% de las copias de ADN producidas. De tal manera que permite analizar la presencia de productos secundarios o mutaciones. El análisis de esta curva de disociación da la información equivalente a examinar la muestra tiñéndola con bromuro de etidio en un gel de agarosa. En la figura 4 se muestra un gráfico que describe con una línea negra el registro de la temperatura en el transcurso del tiempo y en rosa se muestra en que momento se realizaron las mediciones de fluorescencia.

Esta gráfica ilustra como se realiza la programación de la PCR cuantitativa en tres segmentos. El primer segmento, es llamado de activación, en el cual se incuba la mezcla de reacción por 15 minutos a 95°C para separar al anticuerpo que está unido a la enzima polimerasa. En el siguiente segmento se muestra los ciclos de amplificación. Por último se encuentra la curva de disociación descrita previamente.

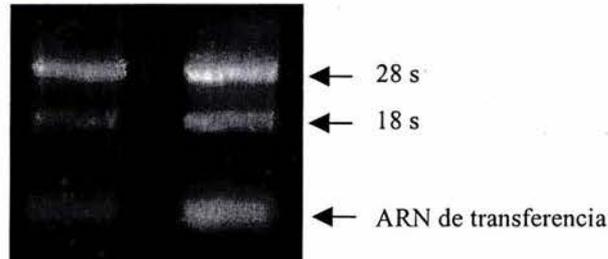


**Figura 4.** Representación gráfica de programación del termociclador *LightCycler*. Esta imagen muestra los 3 segmentos de la PCR cuantitativa. En el primer segmento se representa la fase inicial de activación, el segundo segmento corresponde a la fase de ciclos (desnaturalización, hibridación y polimerización). Por último el tercer segmento representa a la fase de disociación.

## **RESULTADOS:**

### ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL Y CONDICIONES DE PCR.

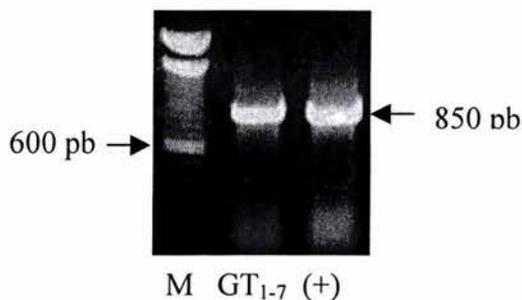
Para este fin se cultivaron células GT<sub>1.7</sub> de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente en la sección de metodología experimental. De igual manera se empleó tejido de cerebro de ratón macho adulto como control positivo, debido a que este órgano expresa todas las isoformas de adenilato ciclasas. Se aisló ARN total de células GT<sub>1.7</sub> y de cerebro de ratón (Figura 5) de acuerdo al método previamente descrito por Chomczynsky y Sacchi en 1987. Una vez obtenidos los ARN totales se procedió a cuantificarlos en el espectrofotómetro y de esta manera verificar la calidad de la extracción mediante el cálculo del coeficiente de pureza correspondiente a la relación entre la densidad óptica de ácidos nucleicos y la de las proteínas. Finalmente se analizó la integridad de los ARN extraídos en un gel de agarosa al 1.2%, identificándose la presencia de las subunidades grande y pequeña del ARN ribosomal. En la banda inferior se localiza el ARN de transferencia.



**Figura 5.** Electroforetograma de ARN separado en un gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se muestra ARN total extraído de células GT<sub>1.7</sub> y en el segundo corresponde a una muestra de ARN total de cerebro.

Tanto el ARN de las células GT<sub>1.7</sub> como el de cerebro fueron retrotranscritos para obtener ADN complementario (ADNc). Para evaluar la calidad de la retrotranscripción se determinó la expresión de la actina (proteína constitutiva) mediante la metodología de la PCR utilizando las condiciones descritas en la sección de metodología experimental.

En la figura 6 se muestra un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio, en el cual se observa en el primer carril marcadores de peso molecular de intervalos de 100 pb, seguido de dos carriles corresponde a los productos de amplificación del gen de la actina utilizando el ADNc obtenido de las células GT<sub>1-7</sub> (segundo carril) y de cerebro (tercer carril), donde se observa que el producto esperado de 850 pares de bases (pb).

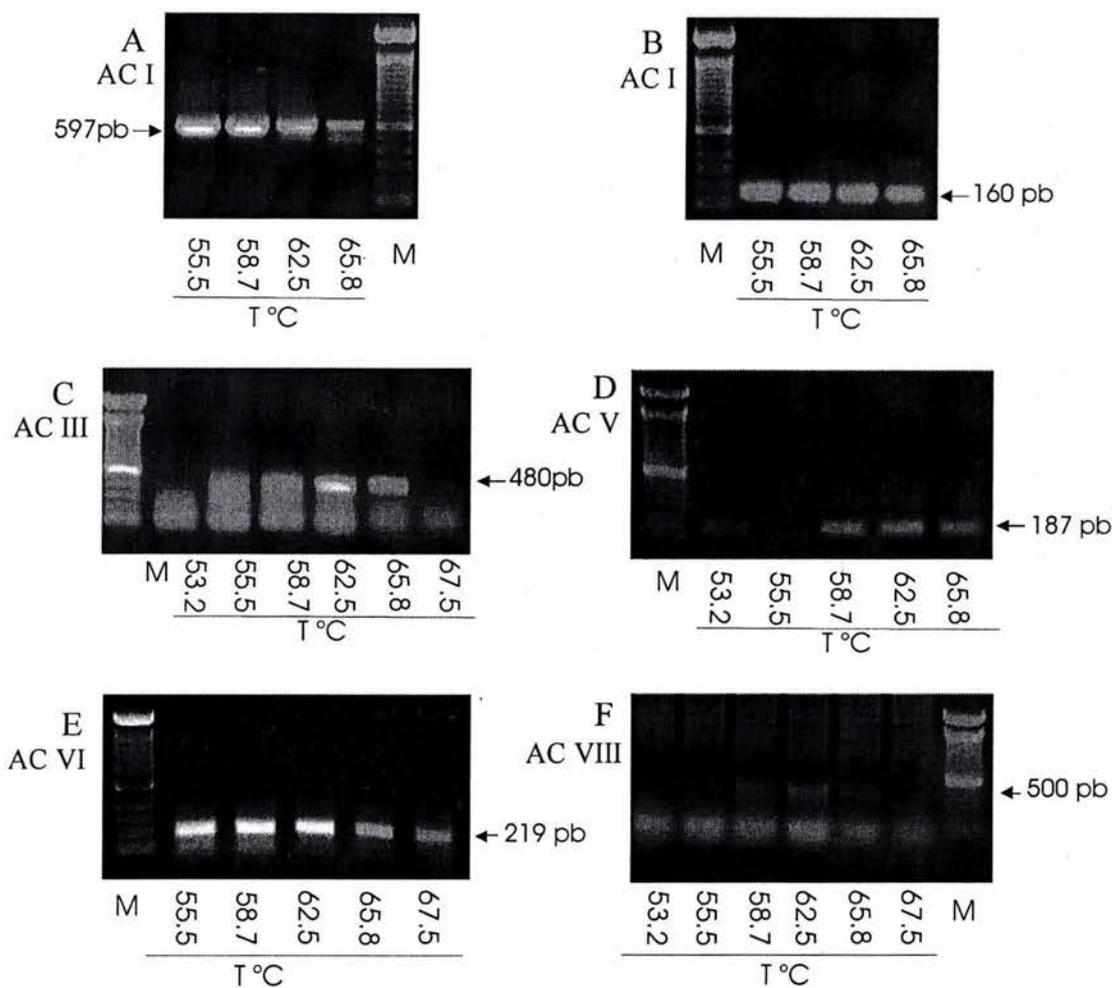


**Figura 6.** Amplificación del gen de la actina utilizando ADNc de GT1-7 y un control positivo (cerebro).

Con el fin de tipificar las isoformas de adenilato ciclasa expresadas en las células GT<sub>1-7</sub> se diseñaron pares de oligonucleótidos de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología. En la tabla 2 ubicada en la sección de metodología, se muestra cada isoforma de la adenilato ciclasa con su correspondiente secuencia de oligonucleótidos y el tamaño esperado del producto de amplificación.

Es importante mencionar que se utilizaron 2 pares de oligonucleótidos para identificar a la isoforma tipo I. Esto se debe a que originalmente se diseñó un oligonucleótido que generaba producto de amplificación con un peso esperado de 597 pb, el cual fue utilizado para realizar la determinación cualitativa de la expresión de la AC I utilizando la PCR convencional, tal como se observa en la figura 8. Sin embargo, cuando se busco determinar de forma cuantitativa la expresión de esta misma isoforma a través de la PCR en tiempo real, se encontró este par de oligonucleótidos era inadecuado para esta metodología, lo cual discutiré con más detalle en la sección de importancia del tamaño del producto de amplificación en la PCR en tiempo real (pagina 49) y por esta razón, se diseñó un segundo par de oligonucleótidos que generara un producto de amplificación menor correspondiente a 160 pb.

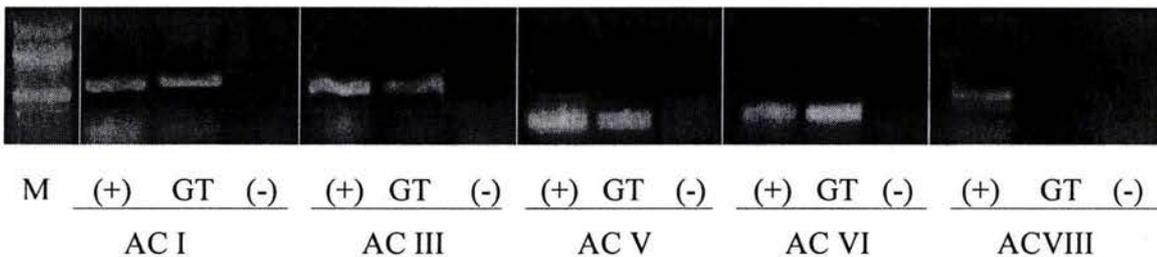
En la figura 7 se muestra el gradiente de todas las isoformas de la adenilato ciclasa sensibles a calcio. De la AC tipo I correspondiente a un producto de amplificación de 597 pb se requería una  $T_m$  de 58.7°C (Figura 7A). Mientras que la AC tipo I (producto de amplificación de 160 pb) y las AC tipo III, V, VI y VIII tiene una  $T_m$  de 62.5°C (Figuras 7 B, C, D, E y F, respectivamente).



**Figura 7.** Electroforesis de agarosa al 1.2% teñida con bromuro de etidio que muestra un gradiente de temperatura de las isoformas: A) ACI con un producto de amplificación de 597 pb, y una  $T_m$  de 58.7°C. B) ACI con un producto de amplificación de 160 pb y una  $T_m$  de 62.5°C. C) ACIII con un producto de amplificación de 480 pb, y una  $T_m$  de 62.5°C. D) ACV con un producto de amplificación de 187 pb, y una  $T_m$  de 62.5°C. E) ACVI con un producto de amplificación de 219 pb, y una  $T_m$  de 62.5°C. ACVIII con un producto de amplificación de 500 pb y una  $T_m$  de 62.5°C.

## ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS ADENILATO CICLASAS SENSIBLES A CALCIO

El objetivo de esta sección es determinar la posible presencia de mensajeros de ARN (ARNm) de cada una de las isoformas sensibles a calcio de la adenilato ciclasa en las células GT<sub>1-7</sub>. Una vez estandarizadas las condiciones de trabajo descritas en la sección anterior validamos la metodología utilizando un control positivo de cerebro de ratón y un control negativo en el que se utilizó agua en lugar de ADNc. En el primer carril de la figura 8 se muestran los marcadores de peso molecular con intervalo de 100 pb. El resto de los carriles se distribuyeron en grupos de 3, en el primer carril de cada grupo se localiza el control positivo, el siguiente carril muestra la amplificación en las células GT<sub>1-7</sub> y en el último carril se representa el control negativo. Estos grupos muestran a las adenilato ciclasas tipo I, III, V, VI y VIII, respectivamente.

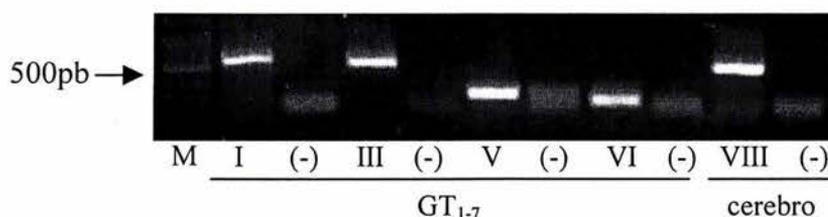


**Figura 8.** Expresión en las células GT<sub>1-7</sub> de las isoformas de adenilato ciclasa sensibles a variaciones de calcio intracelular. A excepción de la adenilato ciclasa tipo VIII, en todos los casos las células GT<sub>1-7</sub> mostraron amplificación positiva para las distintas isoformas.

Como era de esperarse encontramos la expresión de todas las adenilato ciclasas sensibles a calcio en el ADNc de cerebro de ratón, tal como se había descrito en la bibliografía (Hanoune *et al.*, 1997 y Patel *et al.*, 2001) y la ausencia de amplificación en los controles negativos. Asimismo, demostramos la expresión de los ARNm para las ACs tipo I, III, V y VI, más no se detectó la presencia del ARNm de la adenilato ciclasa tipo VIII en las células GT<sub>1-7</sub>. Recapitulando, se clasifican como isoformas tipo I y VIII son activadas por incrementos fisiológicos de calcio y las adenilato ciclasas tipo V y VI son inhibidas bajo estas mismas condiciones. Asimismo, la AC III se ha estado catalogando como AC activable por calcio.

Sin embargo, existen datos experimentales que demuestran que dependiendo de las condiciones, esta isoforma puede ser inhibida por incrementos de calcio intracelular (Wayman *et al.*, 1995). Debido a que encontramos la expresión de ARNm correspondiente a isoformas tanto activables como inhibibles por calcio, nos preguntamos si la proporción relativa de los miembros de estos grupos favorecería a las formas inhibibles, o por el contrario se inclinaba hacia las formas activables.

Con el fin de resolver esta pregunta, analizamos a nivel basal la abundancia relativa de cada una de estas isoformas mediante el método de la PCR cuantitativa, la cual nos permite medir el número de transcritos de cada isoforma en tiempo real. A grandes rasgos, este método se basa en el uso de una curva de estandarización en donde se interpolan los datos de los transcritos de interés para determinar el número de copias de ARNm. Para establecer esta curva de estandarización recuperamos mediante la PCR convencional, los fragmentos de producto amplificado de las distintas isoformas de la AC. Cada fragmento de ADN fue clonado tal como se describe en la sección de metodología. Las clonas correspondientes a las ACs tipo I, III, V y VI fueron obtenidas a partir de la amplificación a partir de las células GT<sub>1-7</sub> y la clona de la AC VIII se obtuvo de cerebro de ratón debido a que no se detectó expresión del ARNm de esta isoforma en estas células. En la figura 9 se muestra un gel de agarosa al 1.2% en donde se observa la amplificación de cada isoforma clonada de las ACs sensibles a calcio. La especificidad de la reacción se verificó utilizando como control negativo a una clona construida con el mismo vector al que se le insertó un fragmento de la enzima inducible de la sintetasa del oxido nítrico (iNOS).



**Figura 9.** Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra un marcador de peso molecular en los siguientes carriles se muestra a los plásmidos de las isoformas de adenilato ciclasa I, III, V, VI y VIII en los carriles 2, 4, 6, 8, respectivamente. El carril siguiente de cada isoforma corresponde a su control negativo (plásmido para iNOS). Las isoformas tipo I, III, V y VI se obtuvieron a partir de ADNc de células GT<sub>1-7</sub> y la AC VIII se obtuvo a partir de ADNc de cerebro de ratón.

Finalmente para confirmar la identidad fueron secuenciadas todas las clonas. Los resultados obtenidos por este método fueron analizados mediante una búsqueda por computadora utilizando el programa *Blast*. Se encontró que cada clona correspondía a su respectiva isoforma de adenilato ciclasa con un alto grado de identidad ( $\geq 98\%$ ).

En el caso de la adenilato ciclasa tipo I se detectó una identidad de 458 de 461 bases secuenciadas lo cual corresponde a un 99% de identidad. De igual manera, la adenilato ciclasa tipo III presentó una identidad de 412 de 416 bases secuenciadas presentando una identidad del 99%. Mientras que la adenilato ciclasa tipo V, encontrándose una identidad de 159 de 160 bases secuenciadas y una identidad del 99%. Asimismo, la adenilato ciclasa tipo VI presentó una identidad de 192 de 192 bases secuenciadas y una identidad del 100%. Por último la adenilato ciclasa tipo VIII mostró una identidad de 271 de 275 bases secuenciadas con una identidad del 98%. A continuación se muestra una tabla en la que se indica el número de referencia del banco genómico (*GenBank*) correspondiente a la secuencia ARNm de cada isoforma, el tamaño esperado del producto y si la secuenciación de los productos obtenidos corresponde con la secuencia del banco genómico. Para examinar los resultados a detalle se anexo en el apéndice I los resultados de las secuenciaciones y su análisis.

Isoforma	Referencia del banco genómico	Producto esperado	Corresponde a la secuencia (porcentaje de identidad)
AC I	gi 20853568	597 pb	Si (99%) Identidad: 458/461
AC III	gi 24475810	480 pb	Si (99%) Identidad: 412/416
AC V	gi 17063797	187 pb	Si (99%) Identidad: 159/160
AC VI	gi 6671512	219 pb	Si (100%) Identidad: 192/192
AC VIII	gi 1814374	500 pb	Si (98%) Identidad: 271/275

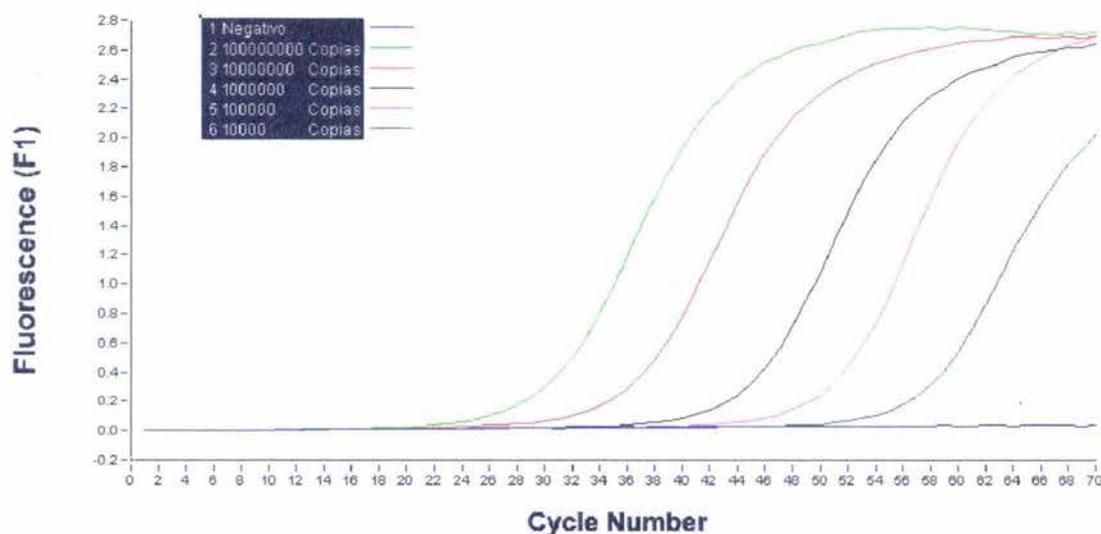
**Tabla 3.** Tabla con números de identidad genómica de cada isoforma y resultados de correspondencia con la secuencia del ARNm.

Una vez comprobada la identidad de las clonas aisladas se cuantificaron por espectrofotometría y se realizaron los cálculos pertinentes para la elaboración de diluciones seriadas que se utilizaron para las curvas de estandarización de la PCR cuantitativa. Por otro lado, se estandarizaron las condiciones necesarias para esta técnica basándonos en las condiciones que se determinaron previamente en la PCR convencional y en las indicaciones del manual del equipo.

Se utilizaron las condiciones descritas en la sección de metodología experimental. Como se mencionó previamente, el método de PCR cuantitativo se basa en la propiedad del *SYBR® green I* de producir una señal de fluorescencia al momento de integrarse entre las cadenas del ADN. A esta técnica se le denomina en tiempo real puesto que se realizan mediciones de fluorescencia al final de cada ciclo, permitiendo monitorear la reacción en el transcurso del tiempo (Ver en: Manual del operador del *Light cycler™*).

### CURVA DE ESTANDARIZACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA TIPO I.

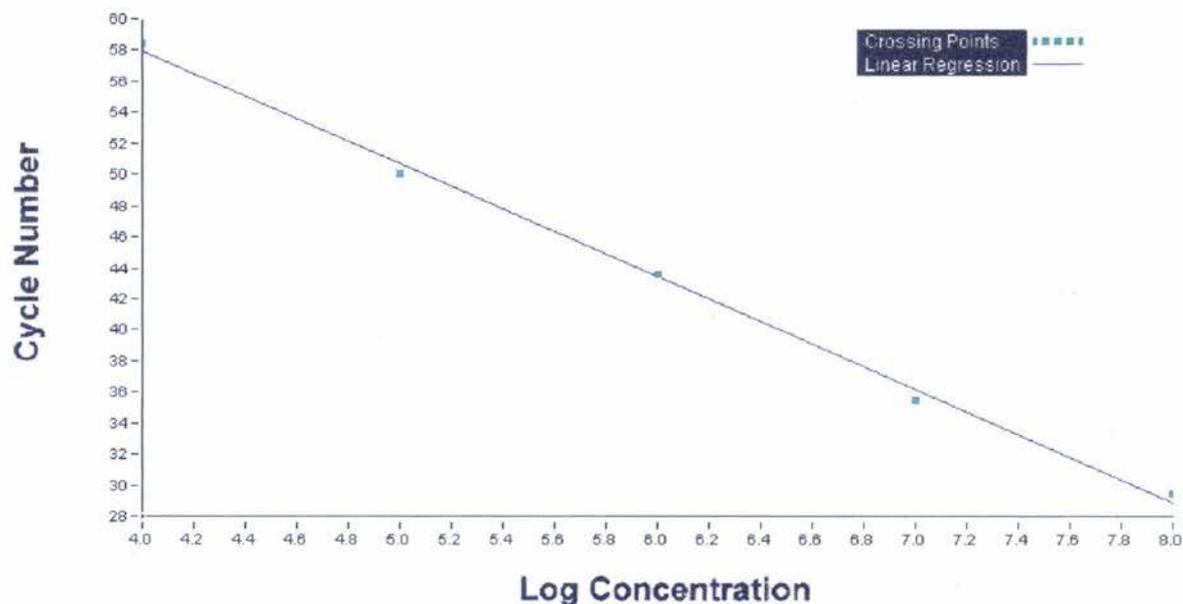
En la figura 10 se muestra la curva de estandarización para la adenilato ciclasa tipo I, donde se graficó el número de ciclos contra la fluorescencia detectada. En la sección de metodología se describe como se calculó el número de copias para realizar las diluciones seriadas. En la curva de color verde se tiene una concentración de  $10^8$  copias de ARNm por reacción. Cada una de las siguientes curvas tienen  $10^7$  (roja),  $10^6$  (negra)  $10^5$  (rosa) y  $10^4$  (verde) copias de ARNm, respectivamente. La curva azul corresponde al control negativo.



**Figura 10.** Representación gráfica de la curva de estandarización de la adenilato ciclasa tipo I. Esta reacción fue monitoreada con SYBR green® I al final de cada ciclo. Las diluciones seriadas corresponden a  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$  moléculas de ARNm, respectivamente y un control negativo.

En la figura 11, se muestra la regresión lineal correspondiente a la curva anterior, en la cual se grafican las intersecciones (relación entre el nivel de fluorescencia determinado arbitrariamente al iniciar el crecimiento exponencial y el número de ciclo en el cual cada estándar alcanzó este nivel de fluorescencia) contra el logaritmo de la concentración teórica de cada muestra.

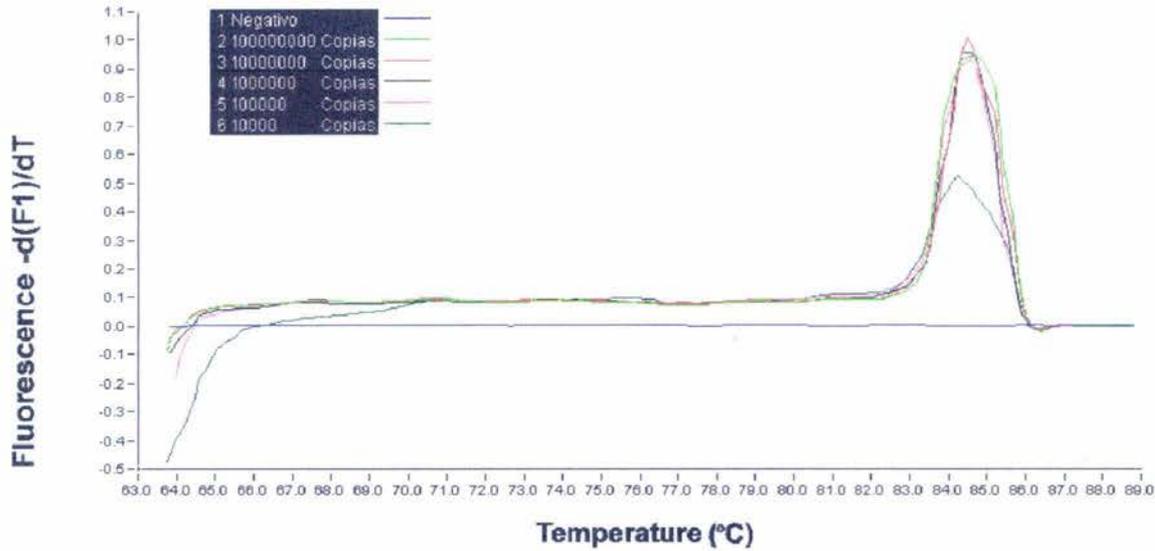
El programa calcula la regresión lineal en base a los datos obtenidos de cada estándar permitiendo incorporar un valor desconocido y determinar su concentración (Ver: Manual operación del *Light cycler*<sup>TM</sup>).



**Figura 11.** Regresión de la adenilato ciclasa tipo I, que corresponde a la curva de estandarización construida a partir de diluciones seriadas de un fragmento de ARNm de ACI.

En la regresión lineal se obtuvo un coeficiente de regresión  $r = -1$ , lo cual nos indica que los valores experimentales son similares a los cálculos teóricos y el signo negativo muestra que existe una relación inversa entre la concentración de la muestra y el número de ciclos, es decir, que a mayor cantidad de producto menor número de ciclos se requiere para alcanzar un nivel de fluorescencia determinado para todas las curvas y que se encuentra antes de que finalice el crecimiento exponencial de la curva de amplificación.

Un último aspecto a evaluar es la calidad de la amplificación, mediante el uso de una curva de disociación. Para este fin, se realizaron mediciones continuas de la fluorescencia abarcando un rango de temperaturas que inicia a partir de 65°C hasta 95°C, de esta manera fue posible identificar en que temperatura se disociaron el 50% de las cadenas de ADN sintetizadas. Estos datos nos ayudan a identificar la presencia de dímeros de oligonucleótidos, amplificaciones inespecíficas o mutaciones. En la figura 12 se muestra la curva de disociación correspondiente a la adenilato ciclasa tipo I.



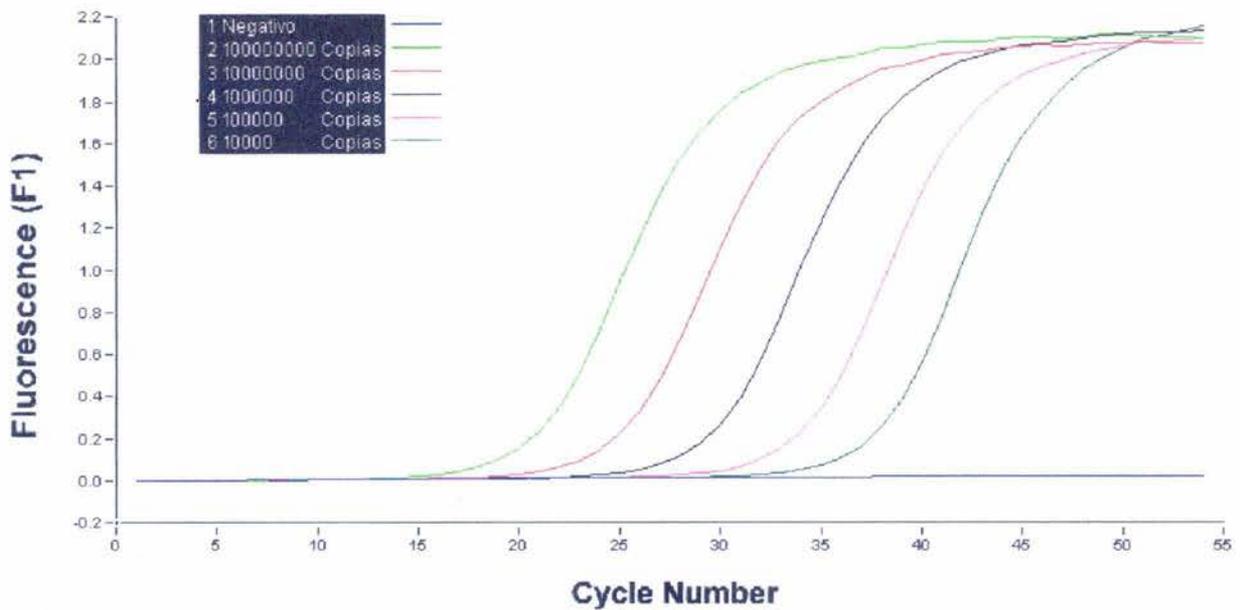
**Figura 12.** Grafica de la curva de disociación de la adenilato ciclasa tipo I. La cual muestra la temperatura de en la cual se disoció el 50% del producto de amplificación. Es importante notar que hubo un pico único de disociación, lo cual indica el grado de pureza del producto obtenido.

En la figura 13 se graficó la temperatura en grados centígrados contra la cantidad de fluorescencia en función de los incrementos de la temperatura. Se puede observar que todos los estándares se disociaron en el mismo rango de temperatura, por lo tanto, se trata de un producto único de amplificación. Los productos de reacción obtenidos fueron analizados por tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa, y se observó que correspondían con el tamaño de producto esperado para la adenilato ciclasa tipo I. Finalmente, se confirmó la identidad mediante de la secuenciación de la clona purificada (se anexa los resultados y su análisis en el programa *blast* en el apéndice I).

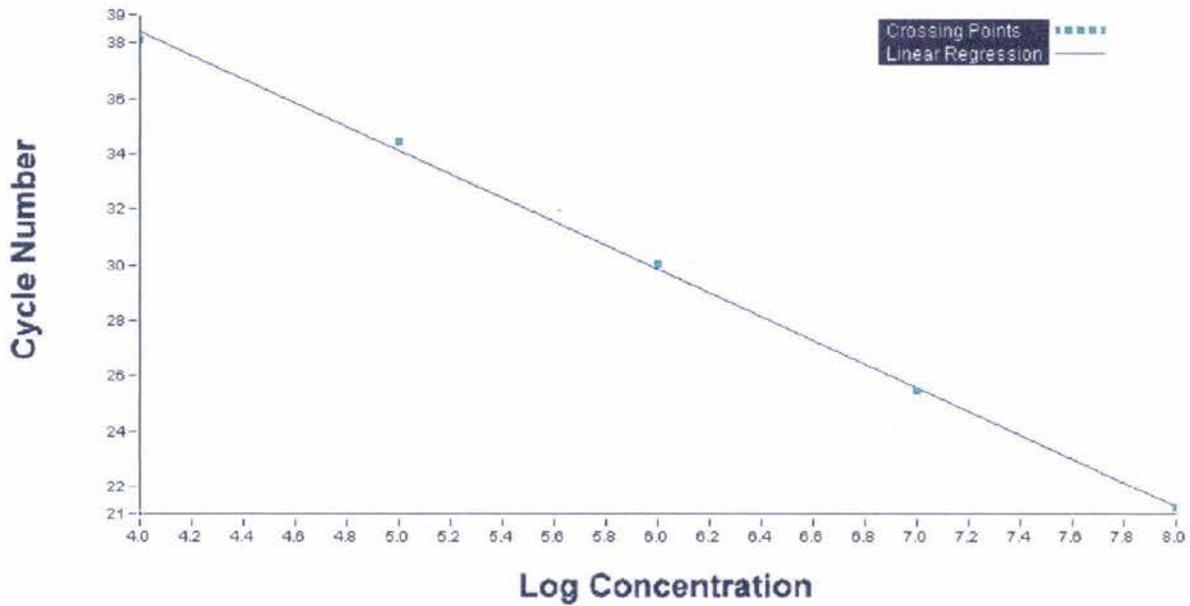
### CURVA DE ESTANDARIZACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA TIPO III.

En la figura 13A se presenta una curva de estandarización de la adenilato ciclasa tipo III, para la cual utilizamos el mismo procedimiento que se describió previamente. En la figura 12B se grafica la regresión lineal con un coeficiente de regresión de -1.0.

A)

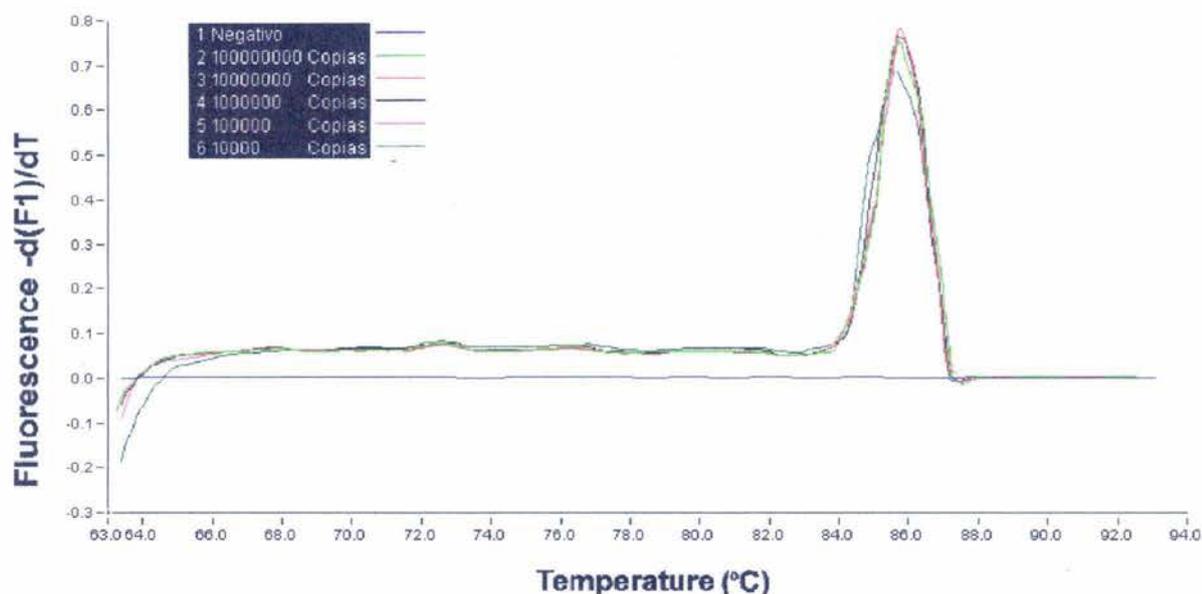


B)



**Figura 13.** Curva de estandarización de la adenilato ciclasa tipo III. A) Representación gráfica de la curva de estandarización de la adenilato ciclasa tipo III. Las diluciones seriadas corresponden a  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  moléculas de ARNm, respectivamente. B) Regresión lineal con coeficiente de regresión de  $-1.0$ .

La curva de disociación de la figura 14 nos indica que se presentó un producto único de amplificación. La especificidad de la amplificación se confirmó mediante el análisis por tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1.2%, detectando que el producto tenía el tamaño esperado. Además se secuenció la clona purificada para verificar su identidad con la adenilato ciclasa tipo III (Anexo en el apéndice I).

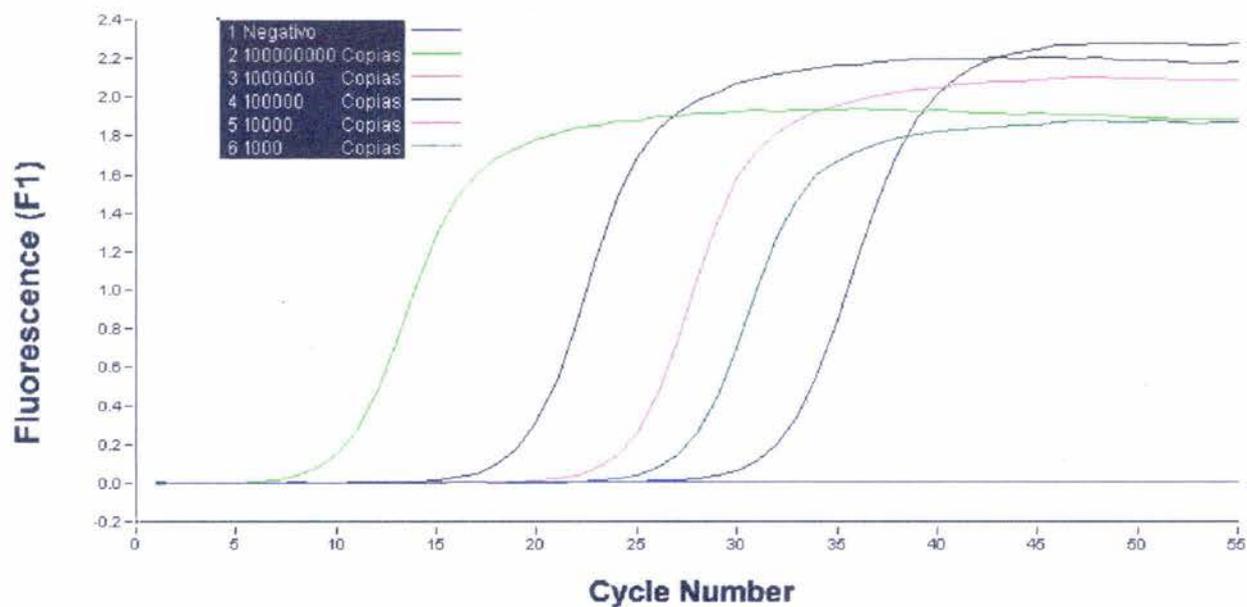


**Figura 14.** Curva de disociación de la adenilato ciclasa tipo III. Se observa un producto único de amplificación en todos los estándares.

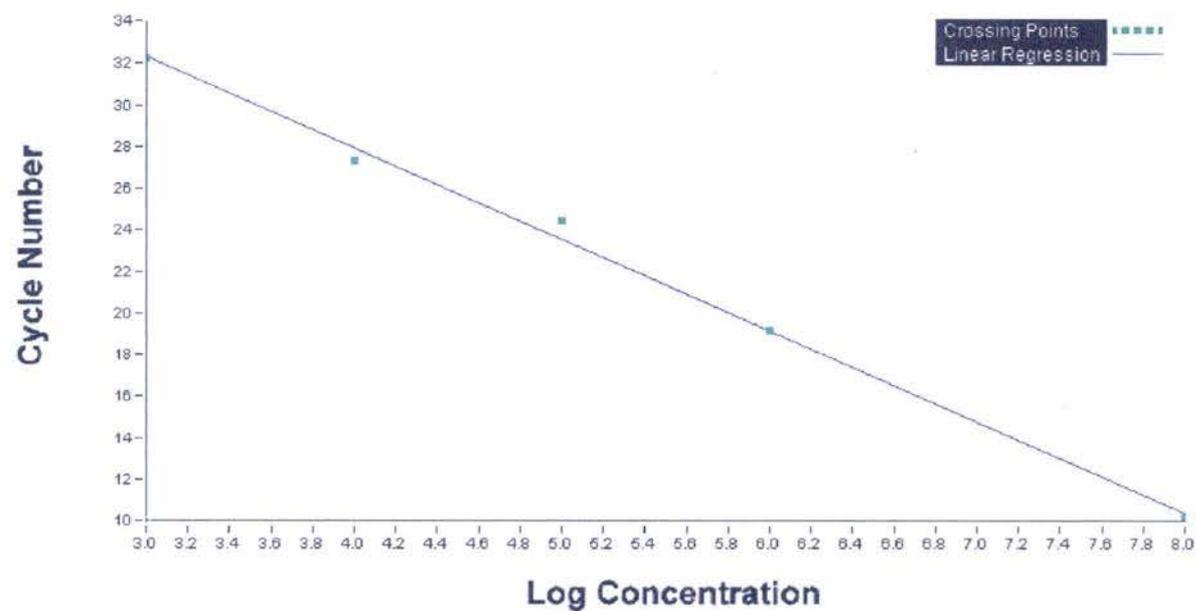
#### CURVA DE ESTANDARIZACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA TIPO V.

Los resultados obtenidos para la adenilato ciclasa tipo V se presentan en las figuras 15 y 16. En la primera figura (14A) se observa una separación entre las dos primeras diluciones, debido a que se utilizó el estándar correspondiente a  $10^8$  copias del mensajero en color verde y posteriormente en color negro se muestra un estándar con  $10^6$  copias de ARNm. El estándar que representa  $10^7$  copias de ARN mensajero fue descartado por no ajustarse en la curva de estandarización. Sin embargo, de acuerdo al fabricante del aparato se considera que la utilización de 5 estándares hace posible construir una curva de estandarización confiable. Además, en la figura 14B se observa que los valores del estándar se ajustan a la regresión lineal con un coeficiente de  $r = -1.0$ .

A)

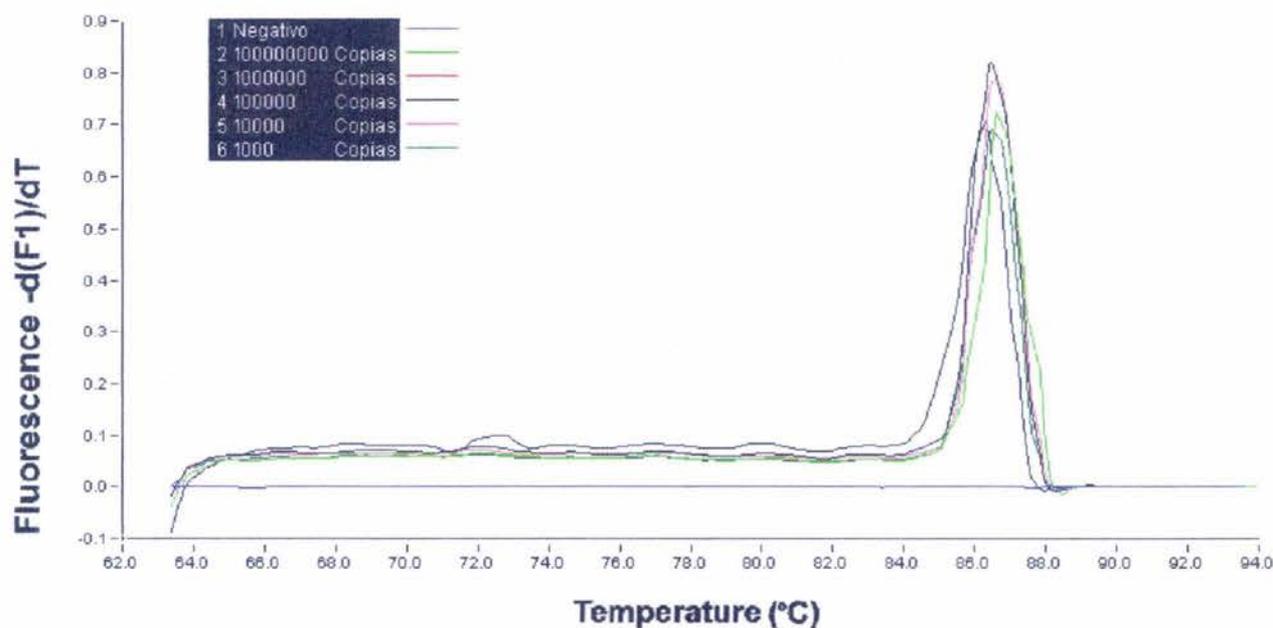


B)



**Figura 15.** Curva de estandarización de la adenilato ciclasa tipo V. A) Representación gráfica de la curva de estandarización de la adenilato ciclasa tipo V. Las diluciones seriadas corresponden a  $10^8$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  moléculas de ARNm, respectivamente y un control negativo. B) Regresión lineal.

Nuevamente se verificó la curva de disociación (figura 16) para confirmar la presencia de un producto único de disociación. En apoyo a estos datos, encontramos que el producto de PCR presentaba el tamaño esperado. El análisis por secuenciación demostró que la clona purificada para esta adenilato ciclasa presentaba un 99% de identidad respecto a la secuencia reportada de la adenilato ciclasa tipo V.

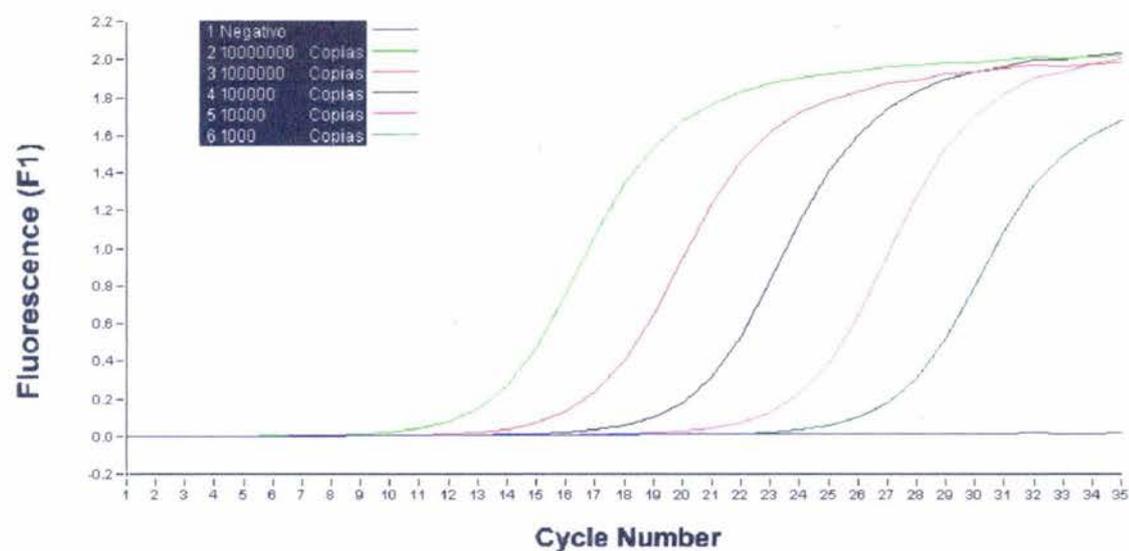


**Figura 16.** Curva de disociación para la adenilato ciclasa tipo V. Nótese un producto único de disociación.

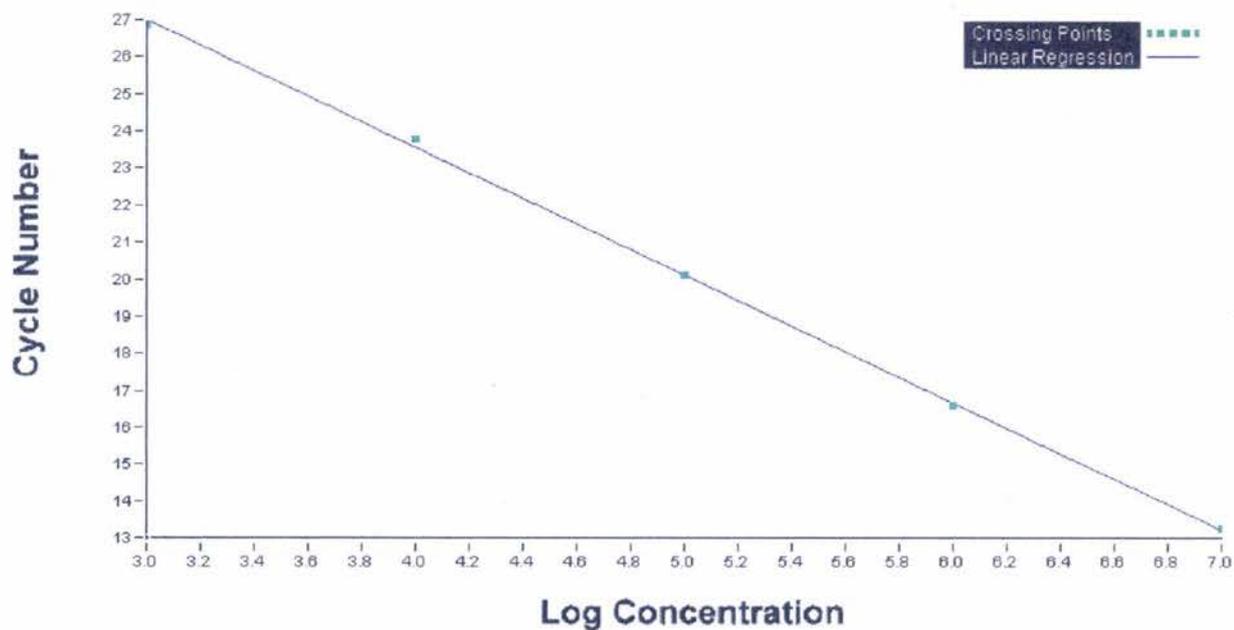
#### CURVA DE ESTANDARIZACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA TIPO VI.

Por último, se realizó la curva de estandarización para la adenilato ciclasa tipo VI. En la figura 17A se pueden observar las diluciones correspondientes a  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  copias de ARNm por reacción. En la regresión lineal se obtuvo un coeficiente de regresión de  $r = -1.0$  (Figura 17B). Se confirmó la identidad los productos obtenidos al analizarlos en un gel de agarosa al 1.2%, en donde se observó que presentaban el tamaño esperado. Además la clona purificada fue secuenciada y se confirmó un alto grado de identidad con la secuencia correspondiente a la adenilato ciclasa tipo VI.

A)



B)



**Figura 17.** Curva de estandarización de la adenilato ciclasa tipo VI. A) Representación gráfica de la curva de estandarización con diluciones seriadas correspondientes a  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  moléculas de ARNm, respectivamente y un control negativo. B) Regresión lineal con un coeficiente de regresión de  $-1.0$ .

En la figura 18 se muestra una curva de disociación correspondiente a la adenilato ciclasa tipo VI. En esta gráfica se observa que se presentó un producto único de amplificación.

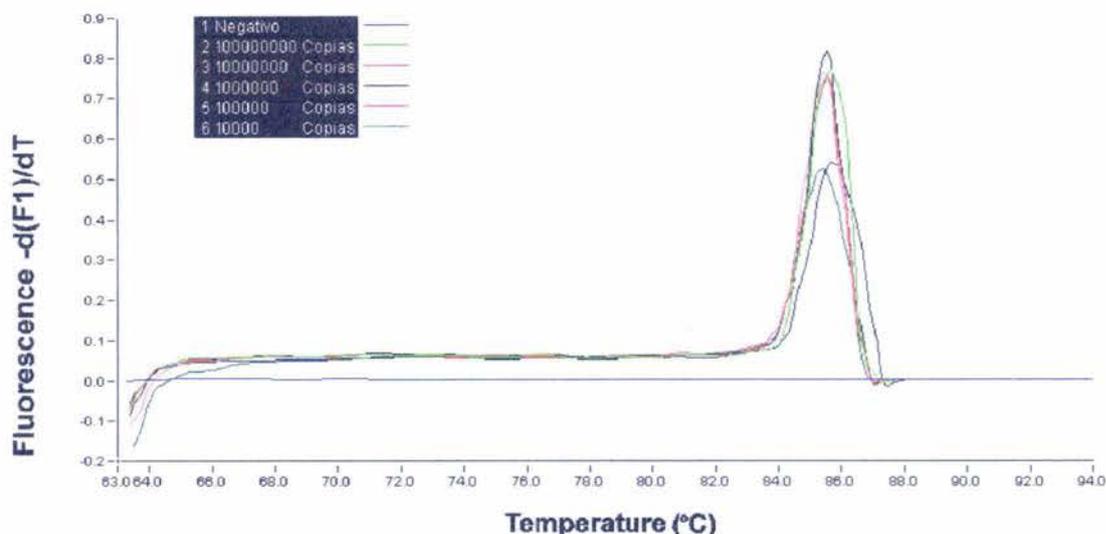


Figura 18. Curva de disociación correspondiente a la adenilato ciclasa tipo VI.

Una vez obtenidas todas las curvas de estandarización se procedió a cuantificar la abundancia relativa de las adenilato ciclasas sensibles a calcio en las neuronas GnRHérgicas. Para este propósito utilizamos como muestras problema a 3 grupos distintos de células  $GT_{1-7}$ , a los cuales se les extrajo el ARNm de manera independiente y se retrotranscribieron para ser amplificadas por duplicado. Con el fin de cuantificar la expresión de estas muestras se utilizó un control negativo que carece de ADNc y un estándar de la adenilato ciclasa en estudio. El uso de este estándar permite contrastar la amplificación de éste con la que corresponde a su posición original en la regresión lineal de la curva estándar realizada previamente, de tal manera que se pueda realizar los ajustes pertinentes mediante el método de segunda derivada para permitir la interpolación de los valores obtenidos de las muestras desconocidas en la curva de estandarización.

## ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL

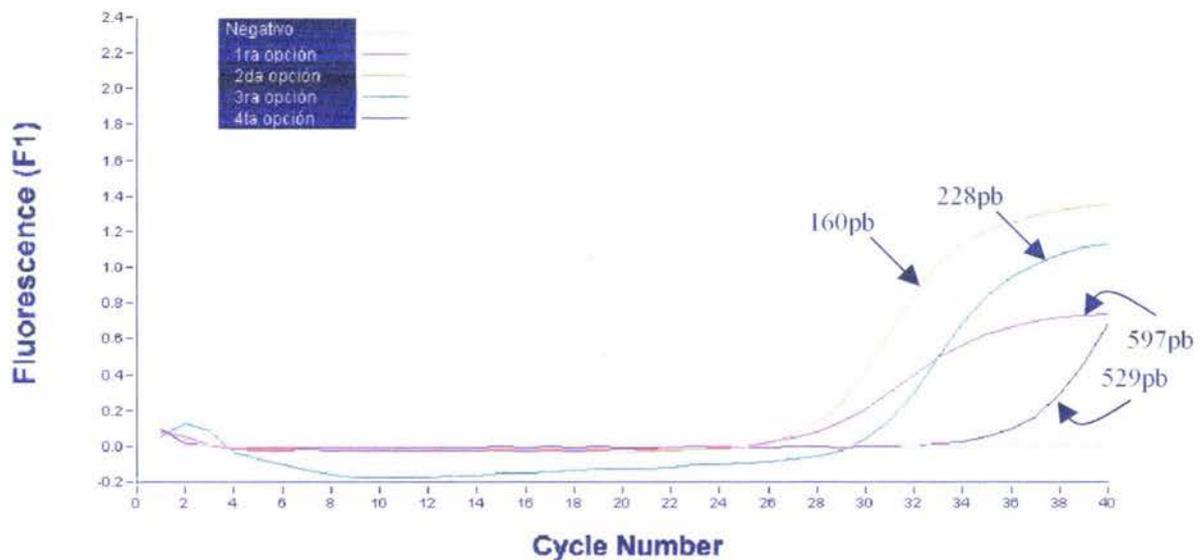
La técnica de PCR cuantitativo tiene la ventaja de ser altamente sensible y detectar niveles muy bajos de expresión, así como de reducir los tiempos requeridos para los ciclos de amplificación. Sin embargo, estas mismas ventajas hacen necesario optimizar los parámetros que participan en la reacción a fin de evitar que se afecte críticamente los resultados. Por un lado, la gran sensibilidad de este método requiere que se optimice la concentración de los oligonucleótidos para que se favorezca la unión de estos al templado y se eluda la formación de dímeros, con lo cual se produciría una fluorescencia inespecífica que influye en la cuantificación del producto y generar un segundo pico de disociación. La literatura ha sugerido utilizar una concentración de oligonucleótidos entre 0.5 y 1.0  $\mu\text{M}$  (Missel *et al.*, 2002 y el manual del operador del *Light cycler*<sup>TM</sup>).

Por otro lado, la gran rapidez con que este equipo lleva a cabo los cambios de temperatura en los ciclos de amplificación implica la necesidad de ajustar los tiempos requeridos para que se lleve a cabo la apropiada alineación de los oligonucleótidos con el templado y posteriormente el tiempo de extensión para que se finalice el proceso de copiado del templado. Para este objetivo, se estandarizaron los tiempos óptimos, encontrando que es recomendable que se utilice un tiempo de alineación de 20 a 30 segundos de alineación (preferentemente 30 segundos) y uno de extensión de 50 segundos lo cual coincide con lo sugerido por la literatura (Missel *et al.*, 2002 y el manual del operador del *Light cycler*<sup>TM</sup>).

## IMPORTANCIA DEL TAMAÑO DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN EN LA PCR EN TIEMPO REAL.

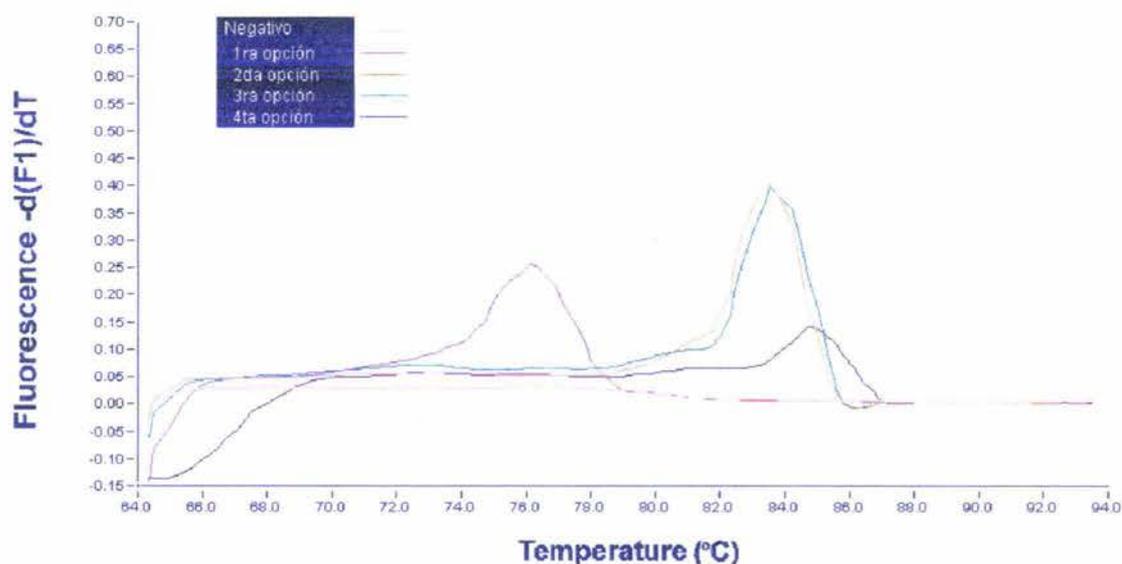
En este punto requiero hacer un paréntesis para mencionar otro parámetro de gran relevancia para la técnica de la PCR cuantitativa. La extensión del producto generado por los oligonucleótidos influye en la especificidad e incluso en la eficiencia de la amplificación. Con el fin de solucionar estos posibles problemas, se sugiere el diseño de oligonucleótidos que generen productos entre 100 y 150pb (Missel *et al.*, 2002).

Por ejemplo, en el caso de la adenilato ciclasa tipo I, se había diseñado un par de oligonucleótidos que reconocían a esta isoforma por la PCR convencional y que produce un producto de amplificación de 597 pb (primera opción). Al momento de probar este juego de oligonucleótidos en la PCR cuantitativa no fue posible detectar su expresión. Esto era sugerente de que el nivel de expresión de esta isoforma era bajo. Sin embargo, supusimos que era suficiente para ser medible, puesto que había sido amplificado en la PCR convencional. Por lo tanto, tratamos de optimizar la reacción con el fin de lograr obtener un dato cuantificable. Para solucionar este problema, se diseñó un par de oligonucleótidos cuyo producto de amplificación fuese de menor tamaño (segunda opción) que se ubicara dentro de la secuencia original de 597pb. La ventaja de este diseño es que hace posible originar otras 2 opciones de pares de oligonucleótidos al combinar los extremos 5' y 3' de cada opción para producir otras dos opciones de tamaño de producto. De estas combinaciones se obtuvo la tercer opción que genera un producto de 228 pb y la cuarta opción con un producto de 529pb. En la figura 18 se muestra la amplificación de las 4 opciones de oligonucleótidos originadas.



**Figura 19.** Curva de disociación de la adenilato ciclasa tipo I, probando diferentes 4 opciones de pares de oligonucleótidos con distintos tamaños de producto esperado (597, 529, 228 y 160pb, respectivamente).

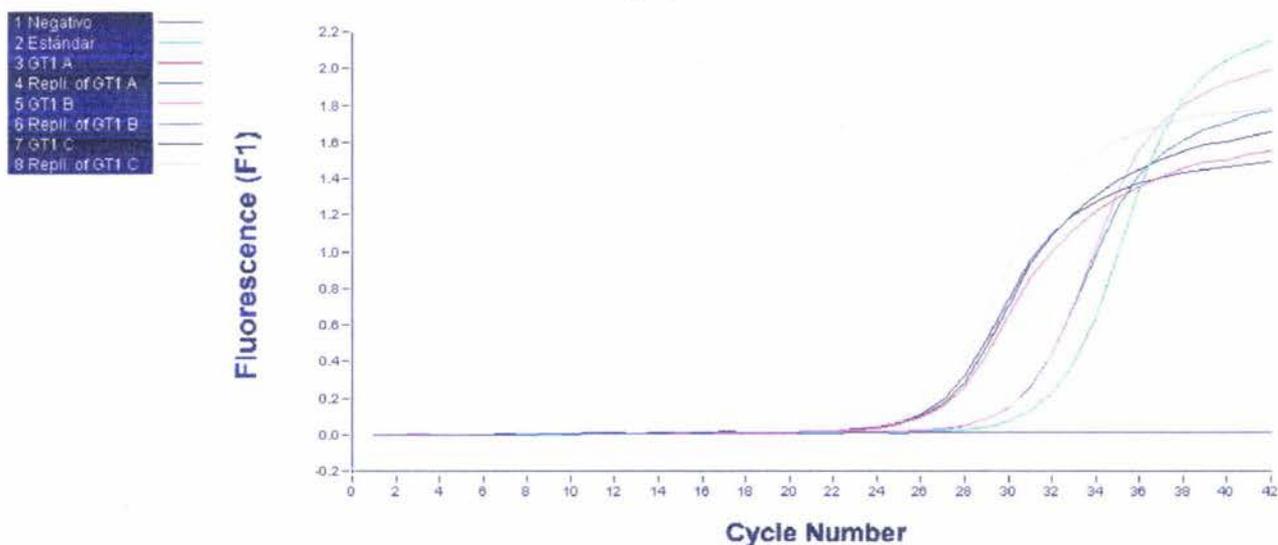
Es importante mencionar que en todas las opciones de oligonucleótidos se utilizó el mismo ADNc. Con los resultados ilustrados en la figura 18 fue posible confirmar que el tamaño del producto generado es esencial para obtener una amplificación más eficiente. En conclusión, las opciones de oligonucleótidos que generan tamaños de 160 y 228 pb producen una buena amplificación. Sin embargo, la opción correspondiente al tamaño de 529 pb aparentemente empieza a amplificar de forma tardía, mientras que la opción que genera un producto de 597 pb tiene una baja eficiencia de amplificación. En la figura 19, se muestra la curva de disociación confirmando que el tamaño del producto generado por los oligonucleótidos es importante para obtener un producto de amplificación específico. Las opciones correspondientes a 160 y 228pb obtuvieron un pico de disociación único en el rango de temperatura esperado para su disociación. Mientras que la primera y cuarta opción produjeron productos de amplificación inespecíficos.



**Figura 20.** Curva de disociación de la adenilato ciclasa tipo I, probando diferentes 4 opciones de pares de oligonucleótidos que generaron 4 tamaños distintos de producto esperado (597, 529, 228 y 160pb, respectivamente).

## CUANTIFICACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA TIPO I.

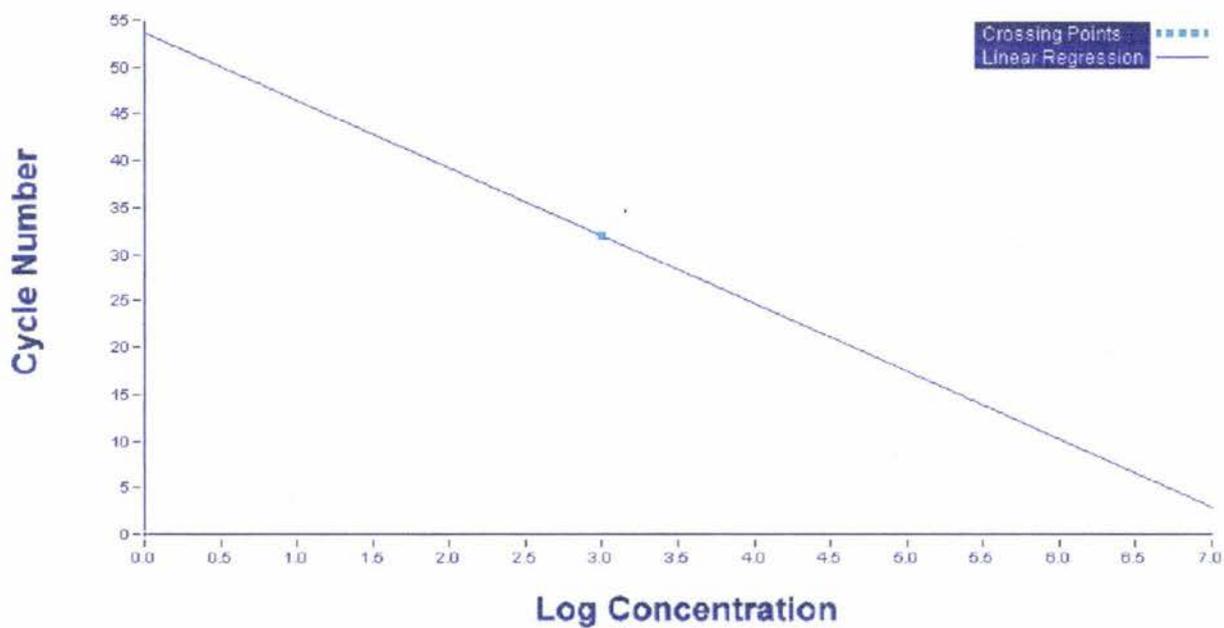
Una vez solucionado el problema del tamaño del producto de amplificación, se prosiguió a cuantificar al ARNm de la adenilato ciclasa tipo I. En la figura 21, se muestra la amplificación de las 3 muestras independientes de células GT<sub>1-7</sub>, cada una determinada por duplicado. Los datos obtenidos de este experimento nos indican una abundancia de 20964 ± 815.7 copias de ARNm/μg de ARN total de esta isoforma de la AC.



**Figura 21.** Curva de amplificación de la adenilato ciclasa tipo I. Se reportó una abundancia de 20964 copias de ARNm/μg de ARN total.

Para la cuantificación se utilizó un control de la curva estándar que correspondía a la  $10^3$  copias de ARNm, de tal manera que mediante cálculos de segunda derivada se podría ajustar la información de este control con la curva estándar previamente realizada y de esta forma utilizar la regresión lineal generada para interpolar los datos de las muestras desconocidas (figura 22A). Posteriormente, se analizó la curva de disociación para la adenilato ciclasa tipo I. En la figura 22B, se puede observar que se encontró un pico que sugiere un producto único de amplificación.

A)



B)

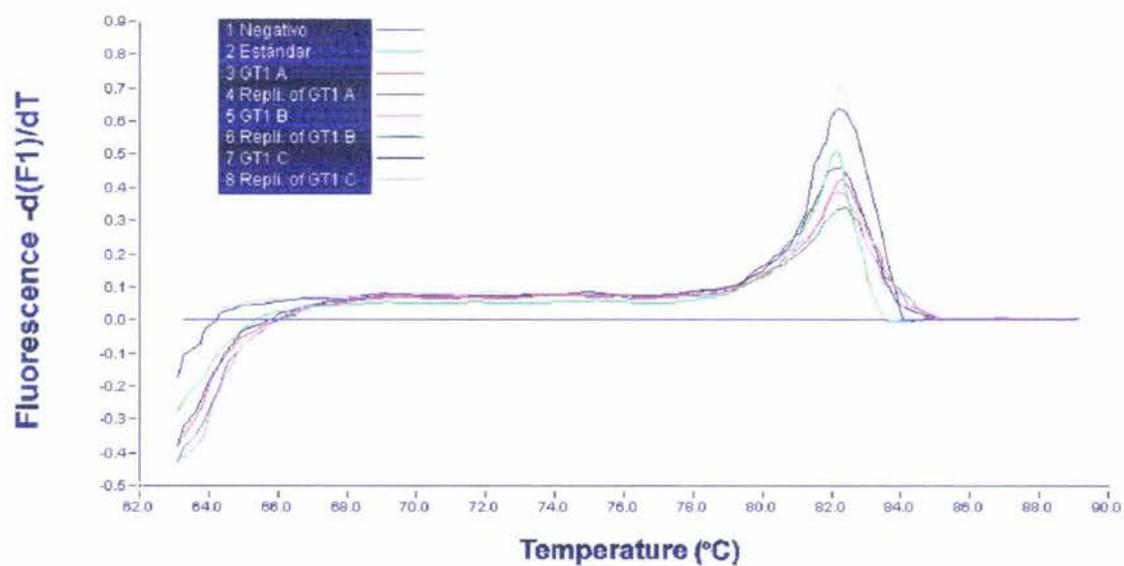
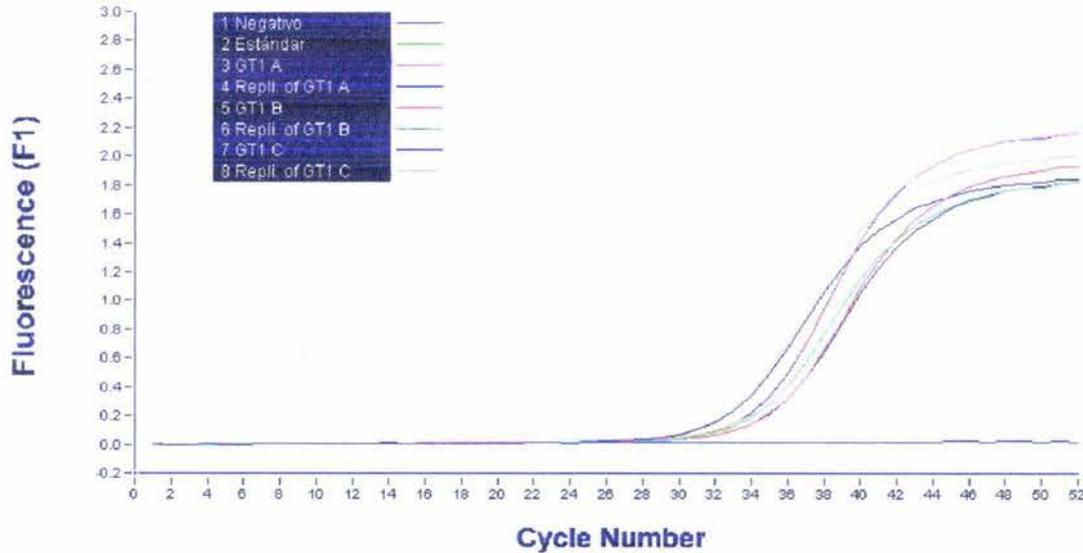


Figura 22. Regresión lineal y curva de disociación de la adenilato ciclasa tipo I. A) Se observa en la regresión lineal que el estándar utilizado se ajusta a la curva de estandarización. B) Curva de disociación en la que se muestra un producto único de disociación.

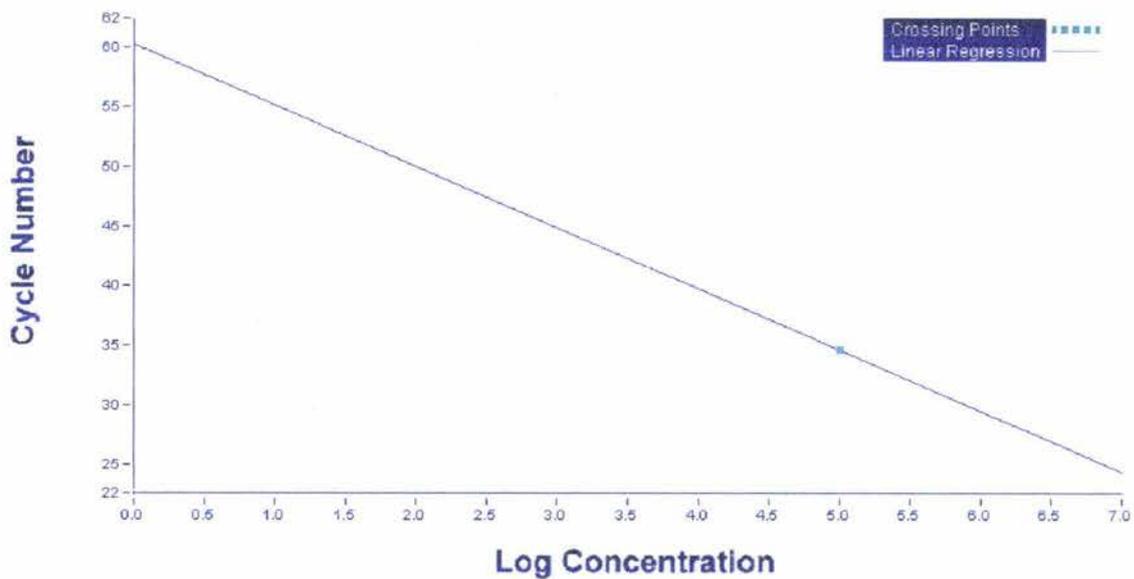
### CUANTIFICACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA TIPO III.

De igual manera se cuantificó una abundancia relativa de  $624583 \pm 24479.2$  copias de ARNm/ $\mu\text{g}$  de ARN total. Utilizando un estándar que corresponde a  $10^5$  copias de ARNm. En la figura 23 se muestra la curva de amplificación (A) y su regresión lineal (B).

A)

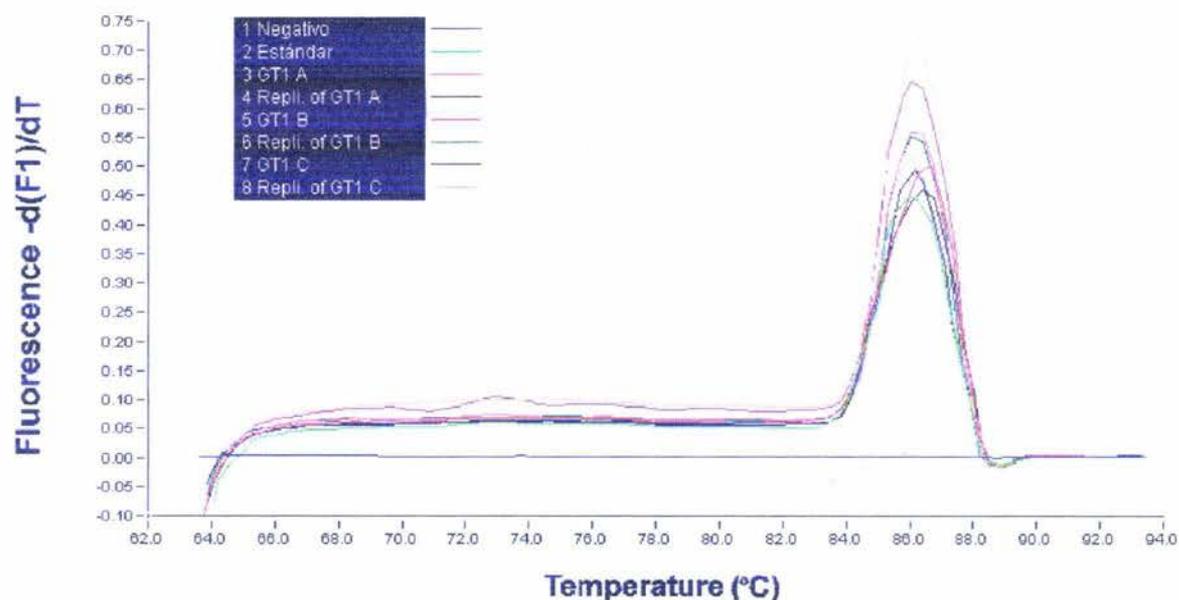


B)



**Figura 23.** Curva de cuantificación de la adenilato ciclasa tipo III. A) Gráfica de la curva de amplificación y B) regresión lineal, donde se observa que el estándar de  $10^5$  copias de ARNm se ajusta a la curva estándar realizada previamente.

En la figura 23A se observa que independientemente de la población de células GT<sub>1-7</sub> utilizadas, se determinó un nivel de expresión similar puesto que en todos los casos amplificaron cerca del mismo ciclo, lo cual indica una cantidad similar de copias de ARNm. Además en el inciso B de la misma figura se observa que el estándar utilizado se ajusta a la regresión lineal de la curva de estandarización previamente realizada. Igualmente se analizó la curva de disociación (Figura 24), en la que se muestra que todas las muestras se disociaron dentro del mismo rango de temperatura.

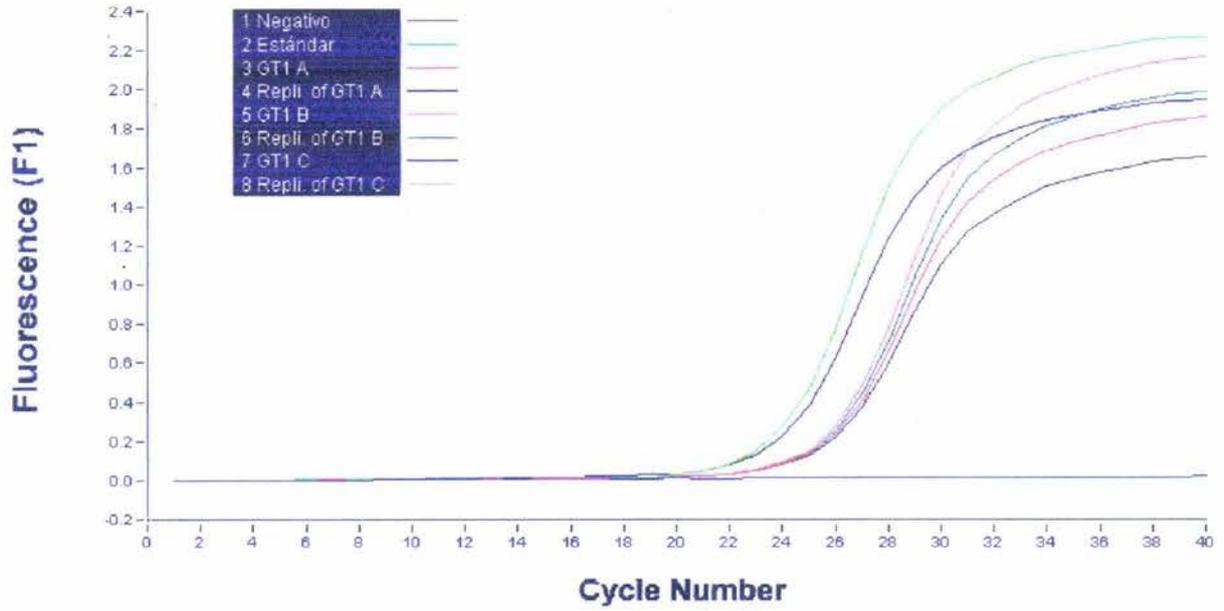


**Figura 24.** Curva de disociación de la adenilato ciclasa tipo III, mostrándose un producto único de amplificación.

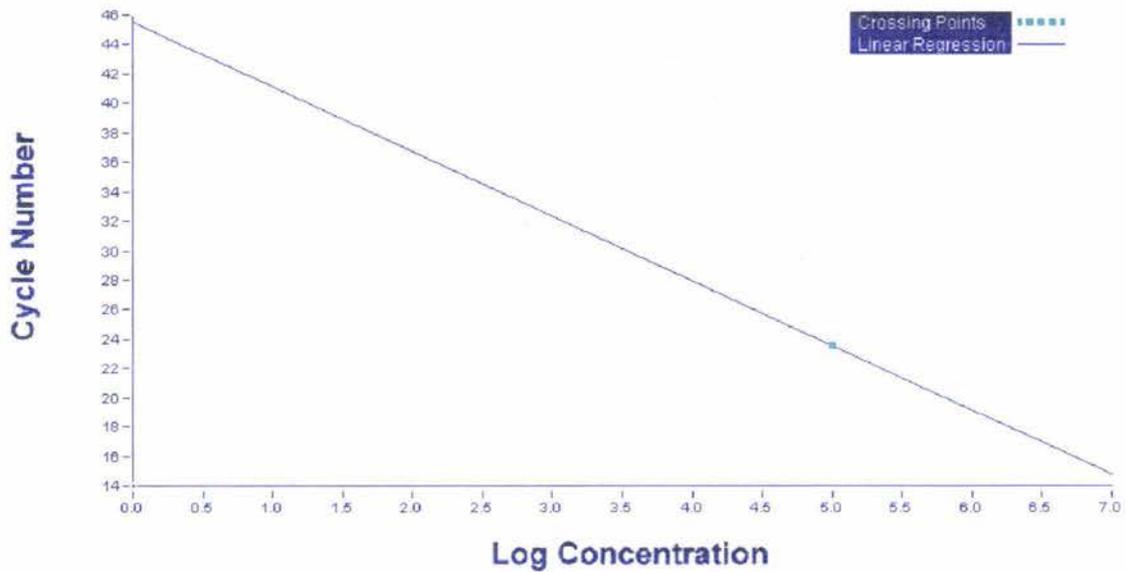
#### CUANTIFICACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA TIPO V.

De la misma forma, se determinó la expresión del ARNm para la adenilato ciclasa tipo V, encontrando que se amplificaron  $345033 \pm 8796.6$  copias de ARNm/ $\mu\text{g}$  de ARN total. En la figura 25A, se muestra la curva de crecimiento exponencial de la amplificación, mientras que en la figura 25B se puede observar que el estándar utilizado de  $10^5$  copias de ARNm se ajusta a la curva de estandarización.

A)



B)



**Figura 25.** Curva de cuantificación de la adenilato ciclasa tipo III. A) Gráfica de la curva de amplificación y B) regresión lineal, donde se observa que el estándar de  $10^5$  copias de ARN se ajusta a la curva estándar realizada previamente.

Nuevamente, se verificó que no hubiese contaminaciones o productos secundarios al ARNm de la adenilato ciclasa tipo V. En la figura 26 se observa que se disoció un producto único de amplificación.

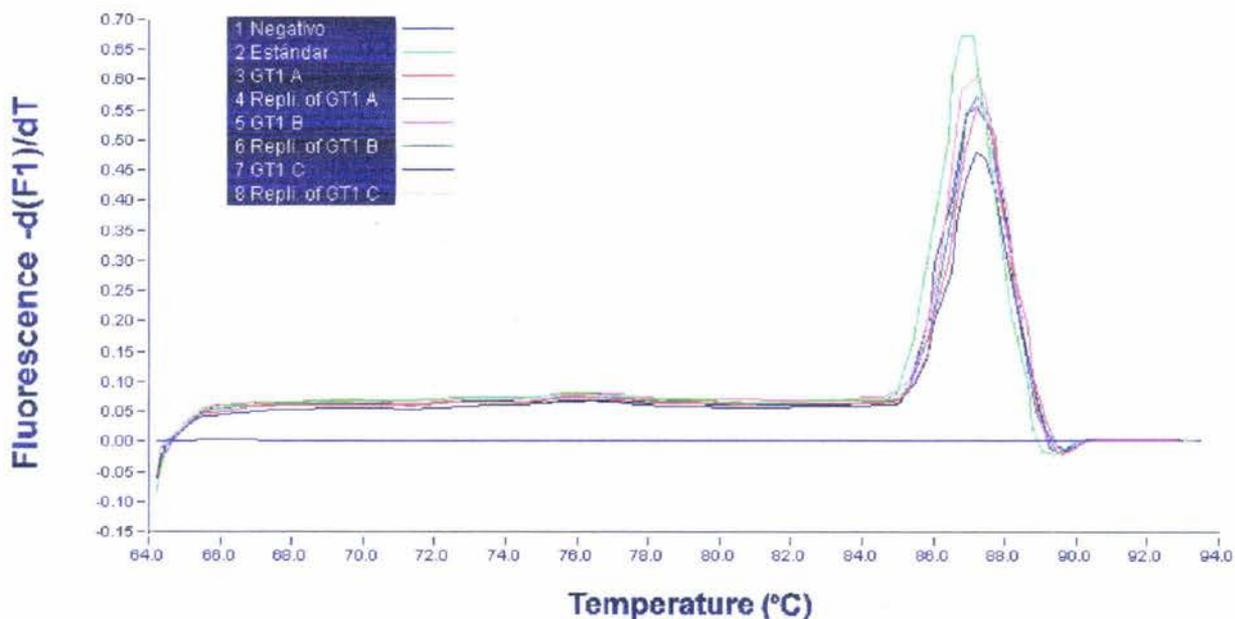
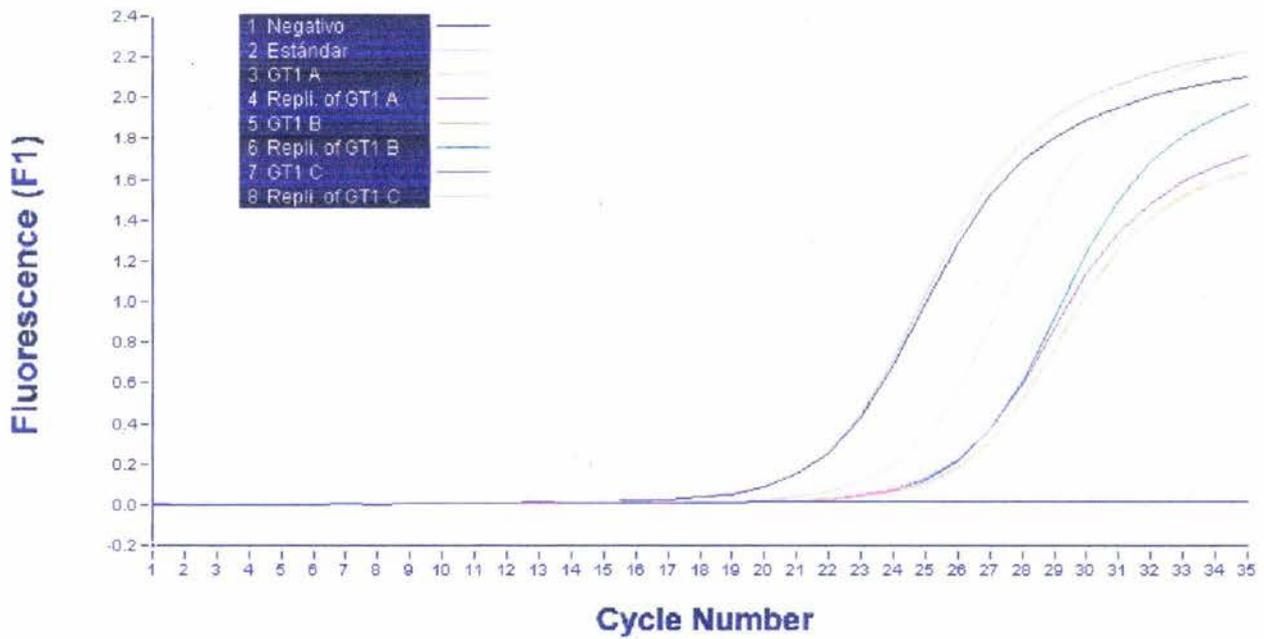


Figura 26. Curva de disociación de la amplificación de adenilato ciclasa tipo V, en células GT<sub>1-7</sub>.

#### CUANTIFICACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA TIPO VI.

De la misma manera que las isoformas anteriores, se realizó la cuantificación del ARNm de la adenilato ciclasa tipo VI, en la que encontramos una abundancia de  $105222 \pm 11048.1$  copias de ARNm/ $\mu\text{g}$  de ARN total. En la figura 27 se observa la gráfica de la curva de amplificación en el inciso A, entre tanto, en la figura 27B se observa que el estándar utilizado de  $10^4$  copias de ARNm se ajusta a la regresión lineal de la curva de estandarización previamente realizada.

A)



B)

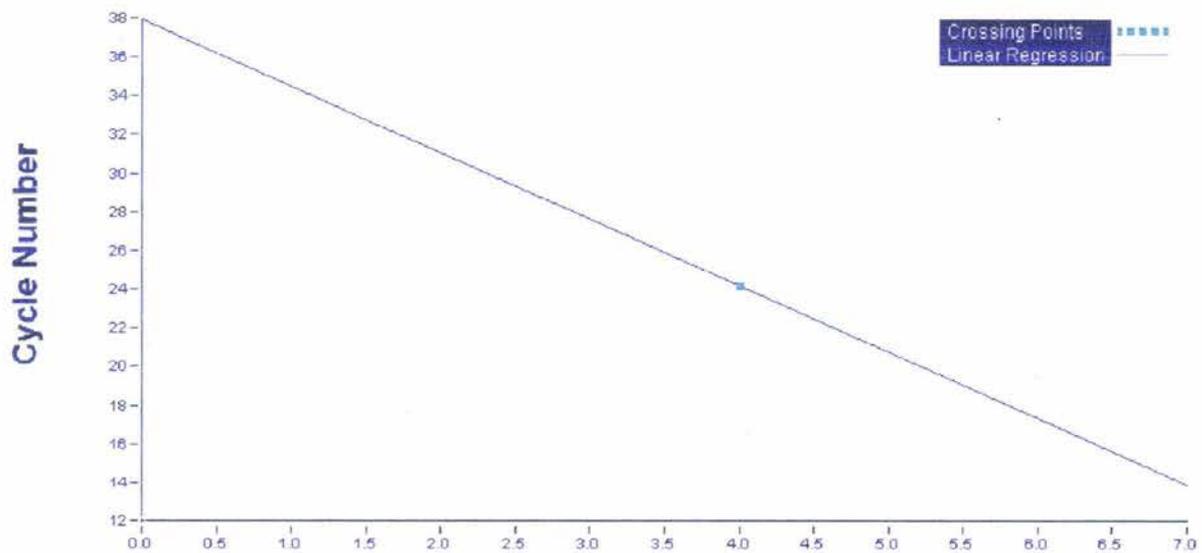
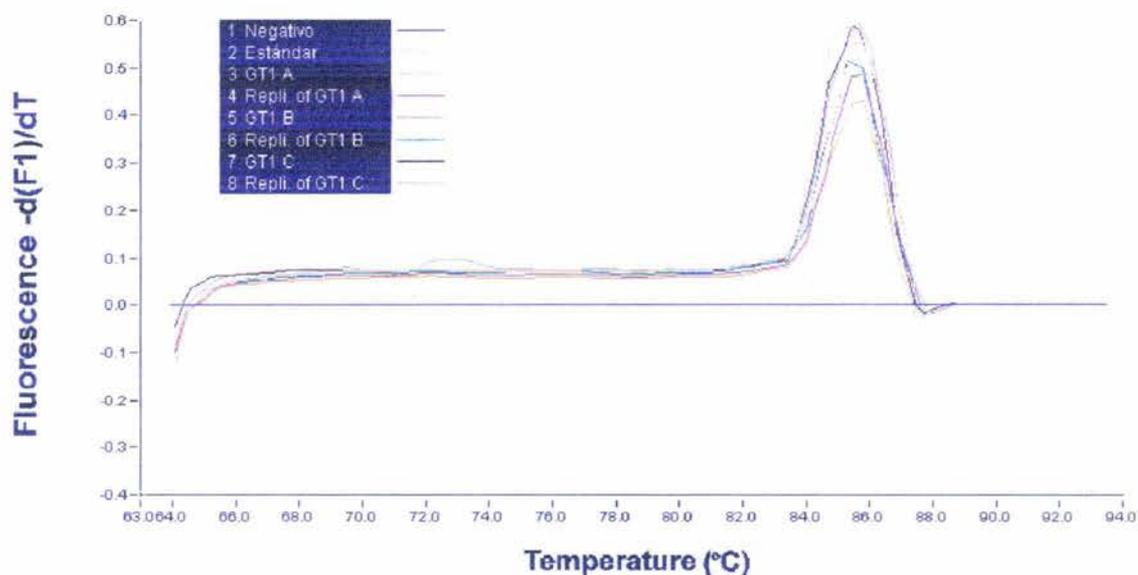


Figura 27. Curva de cuantificación de la adenilato ciclasa tipo VI. A) Gráfica de la curva de amplificación y B) regresión lineal, donde se observa que el estándar de  $10^4$  copias de ARN se ajusta a la curva estándar realizada previamente.

En la figura 28 se muestra la curva de disociación de la adenilato ciclasa tipo VI, en la cual se puede comprobar la presencia de un producto único de amplificación.

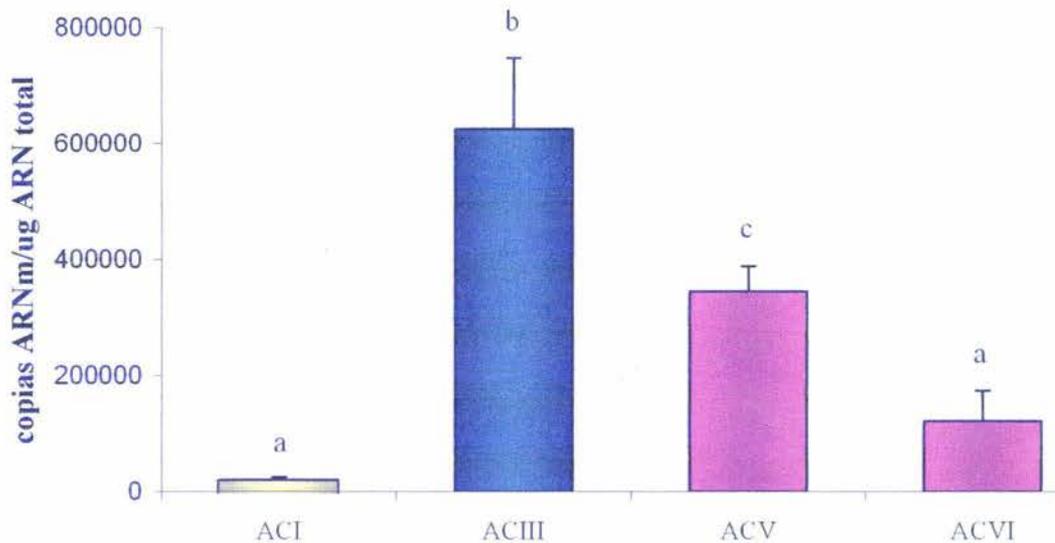


**Figura 28.** Curva de disociación de la amplificación de adenilato ciclasa tipo VI, en células GT<sub>1-7</sub>.

En resumen, se realizó un estudio estadístico de los resultados obtenidos e ilustrados en la figura 29, con el programa estadístico *SigmaPlot*, utilizando la prueba de *Kruskal-Wallis* de una vía. Encontramos que existía una diferencia significativa entre los resultados ( $P < 0.001$ ). Para identificar cuál o cuales isoformas eran diferentes de las demás, se utilizó el método de *Student-Newman-Keuls* que nos reveló que las adenilato ciclasas tipo III y V son significativamente diferentes comparadas contra cualquier otra isoforma e incluso son diferentes entre ellas. Igualmente, se determinó que no existía diferencias entre las adenilato ciclasas tipo I y VI. Estos resultados nos permitieron determinar que en condiciones basales, las células GT<sub>1-7</sub> expresan con mayor abundancia a la adenilato ciclasa tipo III en comparación contra cualquier otra isoforma sensible a calcio, puesto que encontró una abundancia de  $624583 \pm 24479.2$  copias de ARNm/ $\mu\text{g}$  de ARN total y que ocupa el 57% del total de los mensajeros de las adenilato ciclasas sensibles a calcio.

Por otro lado, la adenilato ciclasa V se expresa en menor abundancia en comparación con la anterior, al expresar solamente  $345033 \pm 8796.6$  copias de ARNm/ $\mu\text{g}$  de ARN total y alcanzar una abundancia relativa de 31.5% y que es significativamente mayor que las adenilato ciclasas tipo I y VI. En tercer lugar, encontramos que la adenilato ciclasa tipo VI, expresó  $105222 \pm 11048.1$  copias de ARNm/ $\mu\text{g}$  de ARN total, representa un 9.6% de la proporción relativa. Por último, la adenilato ciclasa tipo I codificó  $20964 \pm 815.7$  copias de ARNm/ $\mu\text{g}$  de ARN total, con una abundancia relativa del 1.9%. En resumen, las AC tipo I y VI no presentan diferencias (a). Por otro lado, las AC tipo III y V son significativamente diferentes entre ellas (b y c), y con respecto a las AC tipo I y VI (a)

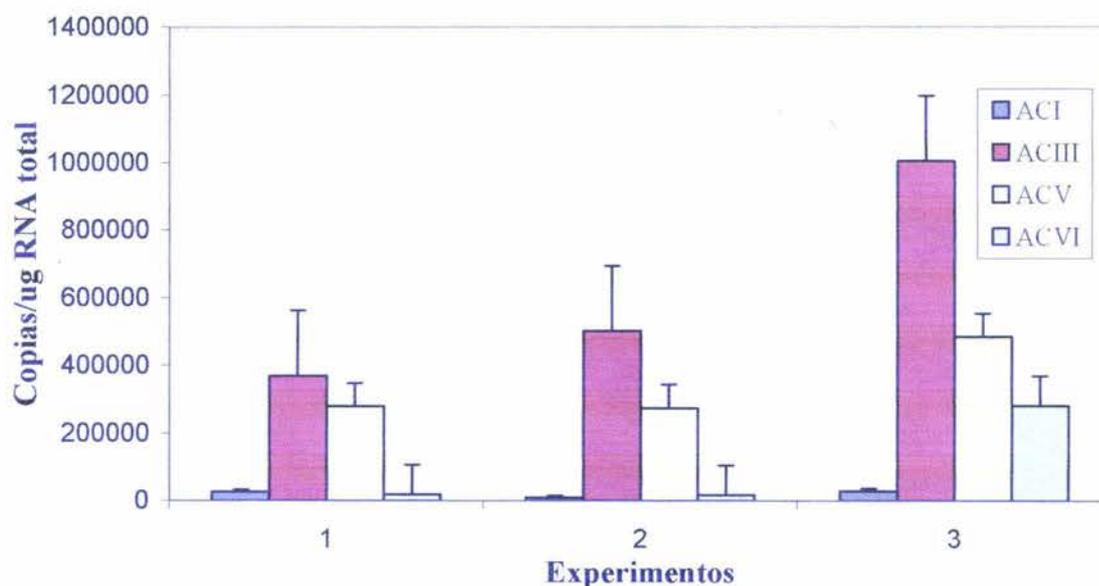
### Proporción relativa de ACs



**Figura 29.** Proporción relativa de expresión de ARNm de las isoformas de adenilato ciclasa sensibles a calcio. Se muestra que existe una abundancia relativa que corresponde al siguiente orden: ACIII>ACV>ACVI=ACI. En color amarillo se muestra a la adenilato ciclasas tipo I que es activable por calcio, se representa en azul la AC III quien es modulada de forma dual calcio y en color rosa a las adenilato ciclasas tipo V y VI que son inhibibles bajo estas mismas condiciones.

Por otro lado, si se analizan los resultados obtenidos de manera que se compare cada uno de los experimentos (figura 30) encontramos que independientemente del grupo de células GT<sub>1-7</sub> utilizadas, se conservó la proporción relativa entre las diversas isoformas de adenilato ciclasa sensibles a calcio. De esta información podemos concluir que a nivel basal, es decir, sin tratamiento alguno se conserva la proporción relativa del ARNm de estas isoformas en línea celular GT<sub>1-7</sub>.

### Proporción relativa en función de los experimentos

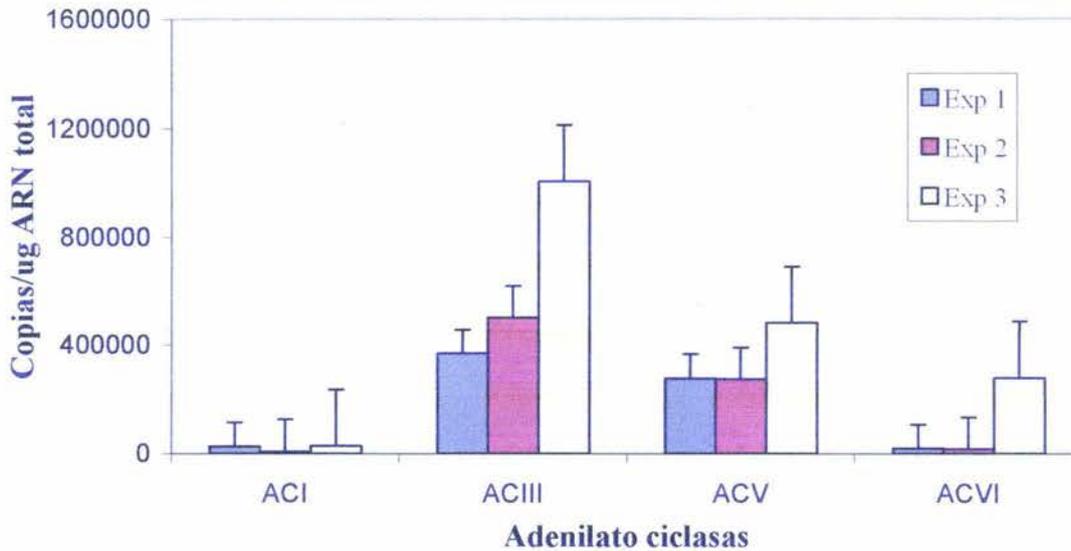


**Figura 30.** Proporción relativa de las ACs. Se muestra la comparación de cómo se expresó cada adenilato ciclasa en los 3 experimentos independientes.

En la figura 31 se realiza una comparación de la expresión de cada experimento en función de la isoforma analizada. A simple vista, en el experimento número 3 se logró observar los niveles más altos de cada isoforma. Esto puede deberse a una mejor preservación de la integridad del ARNm en el proceso de extracción de ARN. Dirigimos nuestra explicación hacia la eficiencia de extracción debido a que en todos los experimentos se utilizó 5µg de ARNm para realizar la retrotranscripción.

Por otro lado, se pudo observar que se alcanzó una eficiencia de extracción similar en las muestras que corresponden a los experimentos 1 y 2. No obstante, no existen diferencias significativas entre las determinaciones que se hicieron en los 3 distintos experimentos para determinar la cuantificación de cada isoforma.

### Proporción relativa en función de la isoforma de AC



**Figura 31.** Proporción relativa de las ACs. Se muestra la comparación de cómo se expresó cada adenilato ciclasa en los 3 experimentos.

Por último, quisiera mencionar que cada caja de cultivo de células  $GT_{1-7}$  contenía aproximadamente  $5.5 \times 10^6$  células y que la extracción de ARN tuvo un rendimiento promedio de  $45\mu g$ . Con esto podemos calcular que se obtuvo cerca de  $8\text{ pg}$  de ARN total por célula. De tal manera que se logró estimar la abundancia relativa de las adenilato ciclasas tipo I, III, V y VI en las células  $GT_{1-7}$  a nivel basal, encontrando que se expresan: 1, 25, 14 y 4 copias de ARNm de su respectiva isoforma por célula.

## **DISCUSIÓN:**

En este proyecto caracterizamos por primera vez la expresión del ARNm que codifica para las diversas isoformas de las ACs sensibles a calcio en la línea celular GT<sub>1-7</sub> mediante las técnicas de RT-PCR convencional y cuantitativa. Nuestros resultados mostraron que se expresa el ARNm de todas las isoformas, excepto la AC VIII, que es activada por un incremento fisiológico de calcio intracelular. Este objetivo surgió con la finalidad de hacer un primer acercamiento al mecanismo molecular involucrado en el efecto inhibitorio tardío y sostenido (con duración de varias decenas de minutos) del GABA en la secreción de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994).

Se ha demostrado que el GABA produce un efecto bifásico sobre la secreción de la GnRH, el cual consiste en una fase inicial de activación rápida en la que se produce un pico de secreción de esta hormona, y posteriormente se presenta una fase de inhibición con duración de varios minutos, caracterizada por una disminución en la tasa de secreción (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). Varios grupos de trabajo estudiaron el mecanismo responsable de la fase inicial de activación del GABA, encontrando que este efecto es mediado por el receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub> al producir una salida de iones de cloro que despolariza la membrana plasmática (Bosma., 1993 y Javors *et al.*, 1998) y produce un aumento en la concentración intracelular de calcio. El efecto excitador del GABA se debe a que las células GT<sub>1-7</sub> tienen un potencial de equilibrio electroquímico del cloro mayor que el potencial de reposo de la membrana. Esta despolarización induce la entrada de calcio por canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Hales *et al.*, 1994 y Spergel *et al.*, 1995) que desencadena un pico de secreción de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994).

De forma consistente con el mecanismo descrito, el GABA también produce un efecto bifásico sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ , el cual es mediado en su totalidad por el receptor GABA<sub>A</sub>, de manera que inicialmente se presenta un incremento rápido y transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$  y este es seguido por un período prolongado de disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  por debajo del nivel basal y perdiéndose el comportamiento oscilatorio característico de este segundo mensajero (Sun *et al.*, 1997).

En relación al mecanismo de acción responsable de la fase inhibitoria del efecto del GABA, poco es lo que se conoce. En trabajos previos del laboratorio se encontró que la activación del receptor GABA<sub>A</sub> también induce una disminución dramática en la síntesis del AMPc que se sostiene por un período prolongado (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001). Este podría ser responsable de la caída sostenida tanto en la  $[Ca^{2+}]_i$  como en la secreción de la GnRH.

La participación del receptor GABA<sub>A</sub> en este fenómeno se identificó mediante estrategias farmacológicas, encontrándose que el efecto del GABA sobre los niveles del AMPc es mimetizado por el muscimol (agonista del receptor GABA<sub>A</sub>) y bloqueado por su antagonista bicuculina (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001). Además, se descartó la participación del receptor metabotrópico GABA<sub>B</sub> ya que el agonista baclofen no mostró efecto (Sun *et al.*, 1997 y Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001). De igual manera, se identificó que esta disminución de la  $[AMPc]_i$  se debe a un decremento de su síntesis, puesto que estos experimentos se realizaron en presencia de inhibidores de fosfodiesterasas (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001).

Dado que se descartó un efecto metabotrópico por el receptor GABA<sub>B</sub> y a que se conoce que el calcio es capaz de modular la actividad de las ACs, nosotros proponemos como un posible mecanismo que el decremento sostenido de la síntesis del AMPc podría ser consecuencia del incremento en la concentración intracelular de calcio que ocurre de forma rápida en respuesta de la activación del receptor GABA<sub>A</sub>. Esta hipótesis se sustenta en la existencia de ACs que son regulables de forma negativa por concentraciones fisiológicas de calcio libre. Sin embargo, también se han descrito isoformas de ACs activables por estas mismas concentraciones de calcio, de tal forma que nuestra hipótesis postula que en las células GT<sub>1</sub> las isoformas inhibibles deben de predominar sobre las isoformas activables. Por lo tanto, nos plantemos el objetivo de buscar, inicialmente de forma cualitativa, la presencia de las ACs regulables por calcio, utilizando técnicas de RT-PCR en las células GT<sub>1-7</sub>.

Como primer escenario, esperábamos que las células GT<sub>1-7</sub> expresaran el ARNm de una o ambas ACs inhibibles por calcio (tipos V y VI), más no de las ACs activables (tipos I y VIII). También determinamos la expresión de una AC (tipo III) que en ciertas condiciones que se discuten más adelante puede ser inhibida por calcio. Los resultados empleando PCR convencional nos mostraron que las células GT<sub>1-7</sub> expresan las dos isoformas de AC inhibibles (tipos V y VI) y dos isoformas activables (tipos I y III). Sin embargo, no detectamos la expresión de la AC VIII.

El haber encontrado una población mixta de ACs sensibles a calcio nos llevó a concluir que el escenario era más complejo de lo esperado inicialmente, surgiendo la posibilidad de que se tratara de una diferencia relativa y no absoluta en el equilibrio entre las formas inhibibles y activables por calcio de ACs. Por lo tanto, nos planteamos un segundo escenario donde existiese un balance a favor de las AC inhibibles (tipo V y VI), de tal manera que se encontraran en una proporción mayor que las activables, a tal grado que una señal de aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  tuviese como consecuencia la disminución absoluta en la síntesis del AMPc (activando a una población pequeña de ACs activables e inhibiendo a una población comparativamente mayor de ACs inhibibles).

Para resolver este segundo escenario, exploramos la proporción relativa de estas dos poblaciones de ACs, y para ello procedimos a estandarizar un método cuantitativo de análisis de expresión del ARNm. Encontramos que las ACs inhibibles tipo V y VI se expresaron con una abundancia relativa de  $345,033 \pm 8,796.6$  y  $105,222 \pm 11,048.1$  copias de ARNm/ $\mu$ g de ARN total, respectivamente. En contraste, la AC activable tipo I solamente son expresadas  $20,964 \pm 815.7$  copias de ARNm/ $\mu$ g de ARN total. Así, cada una de las ACs V y VI tienen una expresión 16 y 5 veces mayor que la AC I. En conjunto, las ACs inhibibles ( $450,255 \pm 19,884.7$  copias de ARNm/ $\mu$ g de ARN total) representan una expresión 21 veces mayor que la expresión de la AC I.

Antes de analizar estos datos, debemos resaltar que la determinación de la proporción relativa de las ACs sensibles a calcio en este estudio se llevó a cabo a nivel del ARNm y no de la enzima misma. Debido a que desconocemos la eficiencia de traducción de cada mensajero, será interesante investigar si se conserva esta proporción relativa de ACs regulables por calcio a nivel de la enzima traducida. Para este fin puede utilizarse la técnica de Western blot y así determinar de forma semi-cuantitativa la proporción relativa de estas isoformas a nivel de la proteína.

A continuación voy a hacer un análisis de los datos considerando que la relación entre el ARNm y la proteína traducida son equivalentes. Bajo esta consideración, los datos obtenidos en este trabajo nos llevan a pensar que un incremento en calcio intracelular inhibiría la actividad global de AC, ya que inhibiría a las AC V y VI. Nosotros especulamos que la baja expresión del ARNm de la ACI se verá reflejada en una baja actividad de esta isoforma. Sin embargo, es necesario evaluar la actividad enzimática global de las ACs para verificar esta propuesta.

Ahora bien, si se toma en consideración a la AC III, la cual se expresa con una abundancia relativa de  $624,583 \pm 24,479.2$  copias de ARNm/ $\mu\text{g}$  de ARN total, encontramos que esta es 1.3 veces mayor incluso que la suma de las isoformas tipo V y VI ( $450,255 \pm 19,884.7$  copias de ARNm/ $\mu\text{g}$  de ARN total). A primera vista, estos resultados sugieren otro escenario que es inconsistente con la hipótesis que planteamos, en términos de que la regulación de las ACs es modulada por cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , y por lo tanto, habría que pensar en un mecanismo alternativo para explicar la acción del GABA sobre la disminución en la síntesis del AMPc. Sin embargo, en relación a este escenario, es importante considerar que la clasificación de la AC III como activable por calcio representa una postura cada vez más refutada por datos experimentales, ya que existen evidencias de que bajo ciertas condiciones que discutiré a continuación, esta isoforma también puede ser inhibida por incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

En el sentido estricto de la palabra, hasta el momento se ha demostrado que el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en concentraciones fisiológicas tiene la capacidad de activar a las isoformas tipo I y VIII e inhibir a las isoformas tipo V y VI. A pesar de que se ha clasificado a la AC III como activable por calcio, el efecto de este ión sobre la isoforma tipo III es controversial. Esta controversia parte de que esta isoforma de la AC no es activable por calcio *per se*, y requiere de otros efectores. En ensayos realizados utilizando membranas aisladas, se determinó que la actividad de la AC III depende de la activación de proteínas  $G_s$  y que en estas condiciones es sinérgicamente estimulada por calcio y calmodulina. En otras palabras, la AC III solamente es estimulada por calcio cuando también es activada fisiológicamente por proteínas  $G_s$  o farmacológicamente por el diterpeno foskolina o por GppNHp que es un análogo no hidrolizable del GTP que activa a la proteína G estimulable (Choi *et al.*, 1992). Además, se encontró que la AC III presenta una sensibilidad al calcio distinta a la de las otras ACs activables por calcio (tipo AC I y VIII). La sensibilidad al calcio de la AC III es 10 veces menor en comparación con las ACs I y VIII (Choi *et al.*, 1992). Estos datos son sugerentes de que los niveles intracelulares de calcio que se alcanzan en las células GT1 en respuesta a GABA, no sean suficientes para rebasar el umbral de sensibilidad de la AC III.

Más aún, de forma contraria a la esperada, Wayman y colaboradores en 1995, encontraron que en experimentos realizados *in situ* (utilizando células HEK 293 transfectadas con ACIII), la activación de la AC III a través de la proteína  $G_s$  es atenuada hasta en un 50% por un incremento de calcio intracelular en el rango de 100-300 nM. A pesar de que aún no se ha establecido cual es el mecanismo de acción por el cual el calcio inhibe la actividad de la AC III, se ha encontrado que esta no es influida por la fosforilación a través de la PKA, PKC, ni es modulada por las proteínas  $G_i$ . Sin embargo, se demostró que la AC III es inhibida al ser fosforilada por la cinasa dependiente de calcio-calmodulina o CaMKII (Wayman *et al.*, 1995). Tratando de buscar el mecanismo de acción por el cual el calcio atenúa la actividad de la AC III, se utilizó como modelo a las neuronas olfatorias, ya que en estas se expresa abundantemente esta isoforma de la AC.

Una posible explicación, es que la AC III es inicialmente activada por proteínas  $G_s$  y que posteriormente es inhibida la actividad de esta isoforma al ser fosforilada por la cinasa dependiente de calcio-calmodulina o CamKII (Wei *et al.*, 1996). Como dato interesante, al parecer las células  $GT_1$  conservan algunas características moleculares de sus orígenes en la placa olfatoria (Silverman *et al.*, 1994) puesto que, como es mostrado en este trabajo, al igual que las neuronas olfatorias, las células  $GT_{1-7}$  expresan de forma abundante la AC III, así como los canales catiónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (Vitalis *et al.*, 2000).

Basándonos en la información obtenida tanto de la literatura, así como los datos experimentales obtenidos en este trabajo nosotros proponemos que existen varias interpretaciones. En primer lugar, nosotros nos inclinamos a pensar que nuestros resultados son consistentes con la hipótesis propuesta puesto que encontramos que las AC inhibibles se encuentran presentes en una proporción importante y las isoformas activables tipo I y VIII se expresan pobremente, e incluso esta última isoforma es indetectable. Respecto a la AC III, nosotros especulamos que a pesar de que se encuentra presente de forma abundante esta podría no participar debido a 2 posibles alternativas. La primera es que esta isoforma no sea estimulada bajo las condiciones producidas por la activación del receptor  $GABA_A$  debido a que esta isoforma requiere de altas concentraciones de calcio intracelular y de la presencia de un co-efector como la proteína  $G_s$ .

Otra alternativa, es que la AC III sea inhibida ante incrementos de calcio en respuesta a la fosforilación producida por la CamKII, tal como se ha descrito previamente en las neuronas olfatorias (Wayman *et al.*, 1995 y Wei *et al.*, 1996). De ser este el caso, el balance a favor de las formas inhibibles por calcio sería aún más marcado. Para resolver de manera directa esta pregunta, será necesario medir la actividad global de AC en respuesta a calcio. Mediante este abordaje de tipo bioquímico se podría demostrar la expresión relativa de las isoformas de AC sensibles a calcio en las células  $GT_{1-7}$ . Este abordaje también permitiría reforzar o refutar la hipótesis de que el mecanismo por el cual el GABA disminuye la síntesis del AMPc es a través de deprimir la actividad de las ACs por calcio.

De manera alternativa o complementaria debo mencionar que las ACs muestran diversos mecanismos de regulación independientes de la modulación por calcio. Por ejemplo, se ha demostrado la influencia de proteínas  $G_s$  y  $G_i$  acopladas a receptores metabotrópicos, así como la regulación a través de la fosforilación por diversas cinasas como son PKA, PKC y la CamKII.

Otro abordaje que permitiría conocer mejor la vía de señalización del AMPc en este sistema es realizar mediciones de este mensajero en tiempo real. Esta determinación es complementaria al análisis de la actividad enzimática y permitiría conocer con alta resolución temporal la dinámica de los niveles del AMPc intracelular en una célula completa e incluso hacer comparaciones entre redes de células  $GT_{1-7}$ .

#### **REFERENCIAS:**

- Belchetz P, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. 1978. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin releasing hormone. *Science*. **202**, 631-633.
- Beltrán-Parrazal L, Norris G, Clapp C, Martínez de la Escalera G. 2001. GABA inhibition of immortalized gonadotropin-releasing hormone neuronal excitability involve  $GABA_A$  receptors negatively coupled to cyclic adenosine monophosphate formation. *Endocrine*. **14**, 189-195.
- Bergen HT, Hejtmancik JF, Pfaff DW. 1991. Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonista and antagonist on LHRH-syntesizing neurons as detected by immunocytochemistry and in situ hybridation. *Exp Brain Res*. **87**, 46-56.
- Billinton A, Ige AO, Bolam JP, White JH, Marshall FH, Emson P. 2001. Advances in the molecular understanding of  $GABA_B$  receptor. *Trens Neurosci*. **24**, 277-282.
- Bless EP, Westaway WA, Schwarting GA, Tobet SA. 2000. Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor manipulation of migrating gonadotropin-releasing hormone neurons through the entire migratory route *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology*. **141**, 1254-1262.
- Bosma MM. 1993. Ion channel properties and episodic activity in isolated immortalized gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. *J Membr Biol*. **136**, 85-96.
- Bormann J. 2000. The "ABC" of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*. **21**, 16-19.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- Chaberdès D, Imbert-Teboul M, Elalouf J. 1999. Functional properties of Ca<sup>2+</sup>-inhibitable type 5 and 6 adenylyl cyclase and role of Ca<sup>2+</sup> increase in the inhibition of intracellular cAMP content. *Cell signal*. **11**, 651-663.
- Charles AC, Hales TG. 1995. Mechanisms of spontaneous calcium oscillations and action potentials in immortalized hypothalamic (GT1-7) neurons. *J Neurophysiol*. **73**, 56-64.
- Chebib M, Johnston GA. 1999. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. **26**, 937-40.
- Choi EJ, Xia Z, Storm DR. 1992. Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin. *Biochem*. **31**, 6492-6498.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. **162**, 156-159.
- Clarke IJ, Cummins JT. 1982. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*. **111**, 1737-1739.
- Clapham DE. 1995. Calcium signalling. *Cell*. **80**, 259-268.
- Constantin JL, Charles AC. 1999. Spontaneous action potentials initiate rhythmic intracellular calcium waves in immortalized hypothalamic (GT1-1) neurons. *J Neurophysiol*. **143**, 429-435.
- Cooper DMF, Mons N, Karpen W. 1995. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signaling. *Nature*. **374**, 421-424.
- Cooper DMF. 2003. Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylyl cyclases by calcium. *Biochem Trans*. **31**, 912-915.
- De Jeu M, Pennartz C. 2002. Circadian modulation of GABA function in the rat suprachiasmatic nucleus: excitatory effects during the night phase. *J Neurophysiol*. **87**, 834-844.
- Drouva SV, Epelbaum J, Hery M, Tapia-Arancibia L, Laplante E, Kordon C. 1981. Ionic channels involved in the LHRH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamus. *Neuroendocrinology*. **32**, 155-162.
- Dhandapani KM, Brann DW. 2000. The role of glutamate and nitric oxide in the reproductive neuroendocrine system. *Biochem Cell Biol*. **78**, 165-179
- Dierschke DJ, Bhattacharya AN, Atkinson Le, Knobil E. 1970. Circadian oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology*. **87**, 850-853.

Donoso AO, Seltzer AM, Navarro CE, Cabrera RJ, Lopez FJ, Negro-Vilar A. 1994. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone secretion by hypothalamic amino acids. *Braz J Med Biol Res.* **27**, 921-932.

Etgen AM, Ansonoff MA, Quesada A. 2001. Mechanisms of ovarian steroid regulation of norepinephrine receptor-mediated signal transduction in the hypothalamus: Implications for female reproductive physiology. *Horm Behavior.* **40**, 169-77.

Favit A, Wetsel WC, Negro-Vilar A. 1993. Differential expression of  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* **133** (5), 1983-1989.

Feigenspan A, Bormann J. 1998. GABA-gated  $\text{Cl}^-$  channels in the rat retina. *Prog. Retinal Eye Res.* **17**, 99-126.

Fink G. 2000. Neuroendocrinology regulation of pituitary function. En: Conn PM, Freeman ME. *Neuroendocrinology in physiology and medicine.* (pp 107-133). Totowa, NJ: Humana Press.

Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. 2001. GABA itself promotes the developmental switch of Neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell.* **105**, 521-532.

Hales TG, Kim H, Longoni B, Olsen RW, Tobin AJ. 1992. Immortalized hypothalamic GT1-7 neurons express functional  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors. *Mol Pharmacol.* **42**, 197-202.

Hales TG, Sanderson MJ, Charles AC. 1994. GABA has excitatory actions on GnRH-secreting immortalized hypothalamic (GT1-7) neurons. *Neuroendocrinology.* **59**, 297-308.

Hammond DL. 2001. GABA<sub>B</sub> receptors: new tricks by an old dog. *Curr Opin Pharmacol.* **1**, 26-30.

Hanoune J, Pouille Y, Tzavara E, Shen T, Lipskaya L, Miyamoto N, Suzuki Y, Defer N. 1997. Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol Cell Endocrinol.* **128**, 179-184.

Hery M, Francois-Bellan AM, Hery F, Deprez P, Becquet D. 1997. Serotonin directly stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from GT<sub>1</sub> cells via 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Endocrine.* **7**, 261-265

Horchkiss J, Knobil E. 1994. The menstrual cycle and its neuroendocrine control. En: Knobil E, Niell JD. *The physiology of reproduction.* (pp 711-749). New York: Raven Press.

Hoth M. 1998. The fate of calcium ions entering a cell. En: Verkhratsky, Toescu. Integrative aspects of calcium signalling. (pp 23-34). Plenum Press, New York.

Javors MA, King TS, Chang X, Ticku MK, Levinson C. 1998. Characterization of chloride efflux from GT1-7 neurons: lack of effect of ethanol on GABA<sub>A</sub> response. *Brain Res.* **780**, 183-189.

Jennes L, Stumpf WE, Tappez ML. 1983. Anatomical relationships of dopaminergic and GABAergic system with the GnRH-systems in the septo-hypothalamic area. *Exp Brain Res.* **50**, 91-97.

Jung H, Shannon EV, Fritschy JM, Ojeda SR. 1997. Several GABA<sub>A</sub> receptor subunits are expressed in LHRH neurons of juvenile female rats. *Brain Res.* **780**, 218-229.

Kaneishi K, Sakuma Y, Kobayashi H, Kato M. 2002. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate augments intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release in immortalized GnRH neurons in a Na<sup>+</sup> -dependent manner. *Endocrinology.* **143**, 4210-4217.

Kardos J. 1999. Recent advances in GABA research. *Neurochem Int.* **34**, 353-358.

Kasuya E, Nyberg CL, Mogi K, Terasawa EI. 1999. A role of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and glutamate in control of puberty in female rhesus monkeys: Effect of an antisense oligodeoxynucleotide for GAD67 messenger ribonucleic acid and MK801 on luteinizing hormone-releasing hormone release. *Endocrinology.* **140**, 705-712.

Keen KL, Burich AJ, Mitsushima D, Kasuya E, Terasawa EI. 1999. Effects of pulsatile infusion of the GABA<sub>A</sub> receptor blocker bicuculline on the onset of puberty in female rhesus monkeys. *Endocrinology.* **140**, 5257-5266.

Kimura M, Osanai T, Okumura K, Suga S, Kanno T, Kamimura N, Horiba N, Wakui M. 2000. Involvement of phosphorylation of  $\beta$ -subunit in cAMP-dependent activation of L-type Ca<sup>2+</sup> channel in aortic smooth muscle-derived A7r5 cells. *Cell Signal.* **12**, 63-70.

Kordon C, Drouva SV, Martínez de la Escalera G, Weiner RI. 1994. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: Knobil E, Niell JD. *The physiology of reproduction.* (pp 1621-1682). New York: Raven Press.

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

Krsmanovic LZ, Mores N, Navarro CE, Saeed SA, Arora KK, Catt KJ. 1998. Muscarinic regulation of intracellular signaling and neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* **139**, 4037-4043.

- Light cycler operator's manual. Octubre 2000. Roche molecular biochemicals. Version 3.5.
- Leranth C, Segura LMG, Palkovits M, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. 1985. The LH-RH-containing neuronal network in the preoptic area of the rat: demonstration of LH-RH-containing terminals in synaptic contact with LH-RH neurons. *Brain Res.* **345**, 332-336.
- MacColl G, Quinton R, Bouloux PMG. 2002. GnRH neuronal development: insights into hypogonadotrophic hypogonadism. *Trends Endocrinol metab.* **13**, 112-118.
- Martina M, Royer S, Paré D. 2001. Cell-type specific GABA responses and chloride homeostasis in the cortex and amygdala. *J Neurophysiol.* **86**, 2887-2895.
- Martinez de la Escalera G, Choi ALH, Weiner RI. 1992a. Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone pulses: intrinsic properties of the GT1-1 cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**, 1852-1855.
- Martinez de la Escalera G, Choi ALH, Weiner RI. 1992b.  $\beta_1$ -adrenergic regulation of the GT<sub>1</sub> GnRH neuronal cell lines: Stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology.* **131**, 1397-1402.
- Martinez de la Escalera G, Gallo F, Choi ALH, Weiner RI. 1992c. Dopaminergic regulation of the GT<sub>1</sub> GnRH neuronal cell lines: Stimulation of GnRH release via D<sub>1</sub> receptor positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology.* **131**, 2965-2971.
- Martinez de la Escalera G, Choi ALH, Weiner RI. 1994. Biphasic gabaergic regulation of GnRH secretion in GT1 Cell Lines. *Neuroendocrinology.* **59**, 420-425.
- Martinez de la Escalera G, Choi ALH, Weiner RI. 1995. Signaling pathways involved in GnRH secretion in GT1 cells. *Neuroendocrinology.* **61**, 310-317.
- Martinez de la Escalera G, Clapp C. 2001. Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone secretion: Insights from GT1 immortal GnRH neurons. *Arch Med Res.* **32**, 486-498.
- Martínez de la Escalera G, Martín C, Jacobi JS y Clapp C. 2002. Regulación neuroendócrina de la reproducción: Mecanismos moleculares involucrados en la secreción de la GnRH. En: Manzo J. *Neuroetología. La Década del Cerebro y la Conducta Animal.* (pp 103-117). Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, México
- Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula C, Roberts JL, Weiner RI. 1990. immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron.* **5**, 1-10.
- Missel A, Decker K, Arentzen S, Kobsch, Löffert D. 2002. Reducing PCR optimization and costs with Quantitec™ SYBER® Green PCR kits on the LightCycler® system. *Qiagen News.* **2**, 3-6.

Nicholls JG. 2001. Indirect mechanisms of synaptic transmission. En: Nicholls JG, Martin AR, Wallace B G, Fuchs PA. From neuron to brain. (pp 177-197). Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Noris G, Hol D, Clapp C, Martínez de la E G. 1995. Histamine directly stimulates gonadotrophin releasing hormone secretion from GT<sub>1,1</sub> cells via H1 receptor coupled to phosphoinositide inositol hydrolysis. *Endocrinology*. **136**, 2967-2974.

Nuñez L, Villalobos C, Boockfor FR, Frawley LS. 2000. The relationship between pulsatile secretion and calcium in single, living gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. **141**, 2012-2017.

Ondo JG. 1974. Gamma-aminobutyric acid effects on pituitary gonadotropin secretion. *Science*. **186**, 738-739.

Paruthiyil S, El-Majdoubi M, Conti M, Weiner RI. 2002. Phosphodiesterase expression targeted to gonadotropin-releasing hormone neurons inhibits luteinizing hormone pulses in transgenic rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**, 17191-17196.

Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K. 2001. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene*. **269**, 13-25.

Pohl CR, Knobil E. 1982. The role of the central nervous system in the control of ovarian function in higher primates. *Ann Rev Physiol*. **44**, 583-593.

Pompolo S, Pereira A, Kaneko T, Clarke IJ. 2003. Seasonal changes in the inputs to gonadotropin-releasing hormone neurons in the ewe brain: An assessment by conventional fluorescence and confocal microscopy. *J. Neuroendocrinology*. **15**, 538-545.

Purves D. 2001. Intracellular signal transduction. En: Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia A, McNamara J, Williams S. *Neuroscience*. (pp 165-178). Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. 1989. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*. **338**, 161-164.

Scott CJ, Clarke IJ. 1993. Evidence that changes in the function of the subtypes of the receptor for  $\gamma$ -aminobutyric acid may be involved in the seasonal changes in the negative-feedback effects of oestrogen on gonadotropin-releasing hormone secretion and plasma luteinizing hormone levels in the ewe. *Endocrinology*. **133**, 2904-2912.

Silverman AJ, Jhamandas J, Renaud LP. 1987. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J Neurosci*. **7**, 2312-2319

Silverman AJ, Livne I, Witkin JW. 1994. The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry and *in situ* hybridization. En: Knobil E, Niell JD. The physiology of reproduction. (pp 1683-1698). New York: Raven Press.

Simeone TA, Donevan SD, Rho JM. 2002. Molecular Biology and ontogeny of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol.* **18**, 39-48.

Spergel DJ, Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Catt KJ. 1995. L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels mediate joint modulation by gamma-amino-butyric acid and glutamate of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and neuropeptide secretion in immortalized gonadotropin-releasing hormone neurons. *Neuroendocrinology.* **61**, 499-508.

Sun W, Jarry H, Wuttke W, Kim K. 1997. Gonadotropin releasing hormone modulates  $\gamma$ -aminobutyric acid-evoked intracellular calcium increase in immortalized hypothalamic gonadotropin releasing hormone neurons. *Brain res.* **747**, 70-77.

Sunahara RK, Taussig R. 2002. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: Multiplicities of signaling. *Mol Interv.* **2**, 168-84.

Tang WJ, Hurley JH. 1998. Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* **54**, 231-240.

Terasawa E, Fernández DL. 2001. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev.* **22**, 111-151.

Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR. 1997. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G $\alpha$ . *Science.* **278**, 1907-1916.

Tobet SA, Chickering TW, King JC, Stopa EG, Kim K, Kuo-Leblank V, Schwarting GA. 1996. Expression of gamma-aminobutyric acid and gonadotropin-releasing hormone during neuronal migration through the olfactory system. *Endocrinology.* **137**, 5415-5420.

Vardi N, Zhang LL, Payne Ja, Sterling P. 2000. Evidence that different cation chloride cotransporters in retinal neurons allow opposite responses to GABA. *J Neurosci.* **20**, 7657-7663.

Vitalis EA, Constantin JL, Tsai P, Sakakibara H, Paruthiyil S, Liri T, Martini J, Taga M, Choi ALH, Charles AC, Weiner RI. 2000. Role of the AMPc signaling pathway in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in GT1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**, 1861-1866.

Wayman GA, Impey S, Storm DR. 1995.  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition of type III adenylyl cyclase *in vivo*. *J Biol Chem.* **270**, 21480-21486.

Wei J, Wayman GA, Storm DR. 1996. Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II *in vivo*. *J Biol Chem.* **271**, 24231-24235.

Weiner RI, Findel P, Kordon C. 1987. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin. En: Knobil E, Neill J eds. *The physiology of reproduction.* (pp 1235-1281). New York: Raven Press.

Weiner RI, Wetsel W, Goldsmith P, Martínez de la Escalera G, Windle J, Padula C, Choi A, Negro-Vilar A, Mellon P. 1992. Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Front Neuroendocrin.* **13**, 95-119.

Witkin JW, Silverman AJ. 1985. Synaptology of LHRH neurons in rat preoptic area. *Peptides.* **6**, 263-271.

Wray S, Nieburgs A, Elkabes S. 1989. Spatiotemporal cell expression of luteinizing hormone-releasing hormone in the prenatal mouse: evidence for an embryonic origin in the olfactory placode. *Dev Brain Res.* **46**, 309-18.

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

Yoshida H, Beltrán-Parrazal L, Butler P, Conti M, Charles AC, Weiner RI. 2003. Lowering cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (cAMP) levels by expresión of a cAMP-specific phosphodiesterase decreases intrinsic pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion from GT1 cells.

Yu HJ, Ma H, Green RD. 1993. Calcium entry via L-type calcium channels acts as a negative regulator of adenylyl cyclase activity and cyclic AMP levels in cardiac myocytes. *Mol Pharm.* **44**, 689-693.

## APÉNDICE I

### Secuenciación ACI

Análisis de la secuencia obtenida de la adenilato ciclasa tipo I por el programa *Blast*, donde se muestra el número de referencia del banco genómico (gi), encontrando una identidad de 458/461 en comparación con la secuencia original.

[gi|20853568|ref|XM\\_125963.1|](#)

Mus musculus similar to adenylyl cyclase type I [Mus musculus] (LOC216530), mRNA  
Length = 2856 Score = 866 bits (437), Expect = 0.0 Identities = 458/461 (99%),  
Gaps = 3/461 (0%) Strand = Plus / Plus

```
Query: 55   tgagaggaacacctttctgagaactcacaacattgagaccttctttattgtgccatccca 114
          |||
Sbjct: 1081 tgagaggaacacctttctgagaactcacaacattgagaccttctttattgtgccatccca 1140

Query: 115  tcggaggaagatattcccaggcttgattctctcggatatcaaaccagccaagaggatgaa 174
          |||
Sbjct: 1141 tcggaggaagatattcccaggcttgattctctcggatatcaaaccagccaagaggatgaa 1200

Query: 175  gttcaagactgtgtgctatctgctggtgcagctcatgcactgccggaaaatgttcaaggc 234
          |||
Sbjct: 1201 gttcaagactgtgtgctatctgctggtgcagctcatgcactgccggaaaatgttcaaggc 1260

Query: 235  tgagatccccttctccaacgtgatgacctgcgaggatgacgacaagcggagggcattgag 294
          |||
Sbjct: 1261 tgagatccccttctccaacgtgatgacctgcgaggatgacgacaagcggagggcattgag 1320

Query: 295  aacagcctcggagaagctcagaaaccgttcgtctttctctactaatgtggtctacaccac 354
          |||
Sbjct: 1321 aacagcctcggagaagctcagaaaccgttcgtctttctctactaatgtggtctacaccac 1380

Query: 355  tccgggtacacgctcaacaggtacatcagccgccttctcgaagcccgccagacagagct 414
          |||
Sbjct: 1381 tccgggtacacgctcaacaggtacatcagccgccttctcgaagcccgccagacagagct 1440

Query: 415  ggagatggccgatctgaacttctttactctgaagt-caaacatgtcgaacgagaacaaaa 473
          |||
Sbjct: 1441 ggagatggccgatctgaacttctttactctgaagtacaaacatgtcgaacgagaacaaaa 1500

Query: 474  at-ccaccagcttcaggacgagt-cttcaccagcgcggttg 512
          ||
Sbjct: 1501 ataccaccagcttcaggacgagtacttcaccagcgcggttg 1541
```

### Secuencia obtenida de la ACI

```
CTCGNTCCCGCATGCTGCAGACGCGTTCGTATCGGATCCAGAATTCGTGATTCCTGAGAGGAACACCTTTC
TGAGAACTCACAACATTGAGACCTTCTTTATTGTGCCATCCCATCGGAGGAAGATAATCCAGGCTTGATT
CTCTCGGATATCAAACCAGCCAAGAGGATGAAGTTCAAGACTGTGTGCTATCTGCTGGTGCAGCTCATGCA
CTGCCGAAAATGTTCAAGGCTGAGATCCCCTTCTCCAACGTGATGACCTGCGAGGATGACGACAAGCGG
AGGGCATTGAGAACAGCCTCGGAGAAGCTCAGAAACCGTTCGTCTTTCTCTACTAATGTGGTCTACACCAC
TCCGGGTACACGCGTCAACAGGTACATCAGCCGCCTTCTCGAAGCCCGCCAGACAGAGCTGGAGATGGCC
GATCTGAACTTCTTTACTCTGAAGTCAAACATGTCTGAACGAGAACAAAAATCCACCAGCTTCAGGACGAGT
CTTACCAGCGCCGTTGCT
```

## Secuenciación ACIII

Análisis de la secuencia obtenida de la adenilato ciclasa tipo III por el programa *Blast*, donde se muestra el número de referencia del banco genómico (gi), encontrando una identidad de 412/416 en comparación con la secuencia original.

[gi|24475810|ref|NM\\_138305.2|](#)

Mus musculus adenylate cyclase 3 (Adcy3), mRNA

Length = 3674 Score = 769 bits (388), Expect = 0.0

Identities = 412/416 (99%), Gaps = 3/416 (0%)

Strand = Plus / Plus

```
Query: 67      tactcggaggagaaggagaagcagagcggggctgccttcagctgctcctgtgtggtcctc 126
          |||
Sbjct: 2012    tactcggaggagaaggagaagcagagcggggctgccttcagctgctcctgtgtggtcctc 2071

Query: 127     ttctgcacggccatggtggagatactcattgaccctggctgatgacaaactatgtgacc 186
          |||
Sbjct: 2072    ttctgcacggccatggtggagatactcattgaccctggctgatgacaaactatgtgacc 2131

Query: 187     tttgtggttggggaggttctgctcctgatcctgaccatctgctcgatggctgccatctt 246
          |||
Sbjct: 2132    tttgtggttggggaggttctgctcctgatcctgaccatctgctcgatggctgccatctt 2191

Query: 247     cccaggtcatttccaagaagcctgtggccttctcatcttgattgaccggaccgctgg 306
          |||
Sbjct: 2192    cccaggtcatttccaagaagcctgtggccttctcatcttgattgaccggaccgctgg 2251

Query: 307     gcaaggaacacctgggcatgttagccatcttcatcttggttatggccaatgttgtggac 366
          |||
Sbjct: 2252    gcaaggaacacctgggcatgttagccatcttcatcttggttatggccaatgttgtggac 2311

Query: 367     atgctcagctgtctccagtaactacatgggaccttacaacatgacagctgggatggagctg 426
          |||
Sbjct: 2312    atgctcagctgtctccagtaactacatgggaccttacaacatgacagctgggatggagctg 2371

Query: 427     gacggcggctgcatggaagaacccaagt-ctacaactacgtagcttgtgctgtcg 481
          |||
Sbjct: 2372    gacggcggctgcatgg-agaacccaagtactacaactacgtagc-tgtgctgtcg 2425
```

## Secuencia obtenida de la ACIII

```
GCTTGATNNACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGCCTGCAGGCGGCCGACTAGTGATTTACAGGTTGAGGGC
AGTCACGGCGCCTGTGACGAGCAGCATGAGCGTCAGCTTCACCATGTGGCTGACCTGCACCAGCATGATGGTGG
CGATGAGCGACAGCACACCTACGTAGTTGTAGTACTTGGGGTTCTCCATGCAGCCGTCGTCCAGCTCCATAACCAG
CTGTCATGTTGTAAGGTCCCATGTAGTACTGGAGACAGCTGAGCATGTCCACAACATTGGCCATAACCAGAATG
AAGATGGCTCACATGGCCCAGGTGTTCTTGGCCAGCGGGTCCGGTCAATCCAAAGATGAGAAGGCCAGGCTT
CTTGAGAAATGACCTGTGACAGATGGGACCATGCCATCCTAGGATATGAGCATACTCCCAACCCAAGGTCC
ATAGTTGTATCAGCAGGGGTCATGAGTTCTCACATGCCGTGCAAAAGGACCAACGACANTANGAACCNNTGTTT
CTNCCCNTATCCC GCN GNGCGACN NNNNNNGGCAAT
```

## Secuenciación ACV

Análisis de la secuencia obtenida de la adenilato ciclasa tipo V por el programa *Blast*, donde se muestra el número de referencia del banco genómico (gi), encontrando una identidad de 159-160 en comparación con la secuencia original.

[gi|17063797|gb|AF417936.1|AF417933S4](#)

*Mus musculus* adenylyl cyclase type V-like gene, exon 2, partial sequence

Length = 199 Score = 301 bits (152), Expect = 2e-79

Identities = 159/160 (99%), Gaps = 1/160 (0%) Strand = Plus / Plus

```
Query: 5   cacgcagcgcctccgagggcatctggtggaccgtgttcttc-tctataccatctacacc 63
          |||
Sbjct: 31   cacgcagcgcctccgagggcatctggtggaccgtgttcttcataccatctacacc 90

Query: 64   tgctgcctgtgcgcatgagggctgcggtgctcagcggggtgcttctgtcggtctccact 123
          |||
Sbjct: 91   tgctgcctgtgcgcatgagggctgcggtgctcagcggggtgcttctgtcggtctccact 150

Query: 124  tggccatctctctgcacaccaactcccagaccagtttcag 163
          |||
Sbjct: 151  tggccatctctctgcacaccaactcccagaccagtttcag 190
```

### Secuencia obtenida de la AC V

```
NGACAGNGAGATGGCNAGTGGAGACCGACAGAAGCACCCCGCTGAGCACCGCAGCCCTCATGCGCACAG
GCAGCAGGGGTGTAGATGGTATAGATGAAGAACACGGTCCACCAGATGCCCTCGGAGGCGCTGCGTGGCTG
TGGCAGCAACAGGCCCACTACCTAN
```

## Secuenciación ACVI

Análisis de la secuencia obtenida de la adenilato ciclasa tipo VI por el programa *Blast*, donde se muestra el número de referencia del banco genómico (gi), encontrando una identidad de 192/192 en comparación con la secuencia original.

gi|6671512|ref|NM\_007405.1|

Mus musculus adenylate cyclase 6 (Adcy6), mRNA. Length = 5841.

Score = 381 bits (192), Expect = e-103.

Identities = 192/192 (100%). Strand = Plus / Plus

```
Query: 94   tgttcccataactccaccctgatactcgggatttatgccgctatcttcctgctggtgctgg 153
          |||
Sbjct: 2155 tgttcccataactccaccctgatactcgggatttatgccgctatcttcctgctggtgctgg 2214
```

```
Query: 154   tcaactgtgctgatctgtgccgtgtgctcctgcgggttctttcttcccccaaggccctgcaac 213
          |||
Sbjct: 2215 tcaactgtgctgatctgtgccgtgtgctcctgcgggttctttcttcccccaaggccctgcaac 2274
```

```
Query: 214   gcctgtcccgcgaatattgtccgctcacgggtgcacagcaccgcgggttggaaatcttctcgg 273
          |||
Sbjct: 2275 gcctgtcccgcgaatattgtccgctcacgggtgcacagcaccgcgggttggaaatcttctcgg 2334
```

```
Query: 274   ttctgcttgtgt 285
          |||
Sbjct: 2335 ttctgcttgtgt 2346
```

### Secuencia obtenida de la adenilato ciclasa VI

```
CTTNGTGNCTTAGATCAGCGCCNCGAGCTCGGGCCCCACACGTGTGGTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGAG
AAGCTTGTCGACGAATTCAGATTGTTCCATACTCCACCCTGATACTCGGGATTTATGCCGCTATCTTCCTG
CTGTTGCTGGTCACTGTGCTGATCTGTGCCGTGTGCTCCTGCGGTTCTTTCTTCCCCAAGGCCCTGCAACGC
CTGTCCCGCAATATTGTCCGCTCACGGGTGCACAGCACCgcgggttggaaatcttctcggTGTGTA
TCACGAATTCTGGATCCGATACGTAACGCGTCTGCAGCATGCGTGGTACGAGCTTTCCCTATAGTGAGTCG
TATTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACAC
AACATACGACCGGAACATAAAGTGTAAGCTGGGGTGCCTAATGAGTGACTAACTCACATTAATTGCGTT
CGGCTCATGCCGCTTCCGTCCGGAACTGTCTGCCACTGATTATGATCGCA
```

## Secuenciación ACVIII

Análisis de la secuencia obtenida de la adenilato ciclasa tipo VIII por el programa *Blast*, donde se muestra el número de referencia del banco genómico (gi), encontrando una identidad de 271/275 en comparación con la secuencia original. En este caso, para realizar la secuenciación se utilizó una clona obtenida a partir de la amplificación de la AC VIII utilizando ADNc de cerebro de ratón, en lugar de células GT<sub>1-7</sub> debido a que esta isoforma no se expresó en esta línea celular.

[gi|1814374|gb|U85021.1|MMU85021](#)

Mus musculus adenylyl cyclase type 8 mRNA, complete cds Length = 4901

Score = 498 bits (251), Expect = e-138

Identities = 271/275 (98%), Gaps = 2/275 (0%) Strand = Plus / Minus

```
Query: 88 aaagagacctgcgtagatgggtctctgtgagcagggcgtagatggctgatcatgatgagta 147
          |||
Sbjct: 3688 aaagagacctgcgtagatgggtctctgtgagcagggcgtagatggc-gatcatgatgagta 3630

Query: 148 gcactgccagcttcaggacagagttaagccgtagaaacacagcacaggtcaccatggcca 207
          |||
Sbjct: 3629 gcactgccagcttcaggacagagttaagccgtagaaacacagcacaggtcaccatggcca 3570

Query: 208 acaccccagtgaaagacaaagtactctgggtaggagcagatatctgtaaacacagctgagg 267
          |||
Sbjct: 3569 acaccccagtgaaagacaaagtactctgggtaggagcagatatctgtaaacacagctgagg 3510

Query: 268 aattgaaagtcagggttctcaagggatcgacttgtaaaatcacaccacagaatattta 327
          |||
Sbjct: 3509 aattgaaagtcagggttctcaagggatcgacttgtaaaatcacaccacagaatattta 3450

Query: 328 ggacaggctcccaggaagttaattaagatggaagc 362
          |||
Sbjct: 3449 ggaca-gctcccaggaagttaattaagatggaagc 3416
```

## Secuencia obtenida de la ACVIII

```
TACGCCAGCTCTATACGACTCCTATAGGGAAAGCTCGGTACCCGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGATCCA
GAATTCGTGATTAAGAGACCTGCGTAGATGGTCTCTGTGAGCAGGGCGTAGATGGCTGATCATGATGAGTAGC
ACTGCCAGCTTCAGGACAGAGTTAAGCCGTAGAAACACAGCACAGGTCACCATGGCCAACACCCCAGTGAAGAC
AAAGTACTCTGGGTAGGAGCAGATATCTGTAAACACAGCTGAGGAATTGAAAGTCAGGTTCTCAAGGGTATCG
ACTTGCAAAATCACACCACAGAATATTTAGGACAGGCTCCCAGGAAGTTAATTAAGATGGAAGCCGCGATCAT
GACTTGCGGTTTTTCGTGGGTGTATTAATCCAACAGCAGGTTTTTGGAGGATGAGGGGCAGCCTTATAGTCTTCTG
CTGTGGCGTGAGGCCAGGCAGAGTGCACATGATCAGGTGAAACTGGTAGTCATAGGCTCAGCTTGAAAAGCANN
ACTTTATTGAGGANACAGAAACNTATGCNN
```