



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM-JURIQUILLA

REGULACIÓN GABAÉRGICA DE LA
ACTIVIDAD DE LAS ADENILATO CICLASAS
EN LAS CÉLULAS GT1.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A
M. en C. CECILIA MARTÍN GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA LORENZO

Juriquilla



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mi tutor que pacientemente me ha acompañado y dirigido en este proceso de maduración para mi formación como científica. Asimismo, agradezco la especial colaboración de la Dra. Carmen Clapp.

A mi comité tutorial por su excelente dirección: Dr. Mauricio Díaz Muñoz y al Dr. Luis Vaca Domínguez. Al igual que a los miembros del jurado que realizaron valiosas observaciones enriqueciendo este trabajo de tesis: Dr. Ricardo Tapia Ibangüengoytia, Dr. Luis Vaca Domínguez, Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar, Dr. Enrique Pedrera Asteguiano, Dr. Rogelio Arellano Ostoa y a la Dra. María Teresa Morales Guzmán.

De igual manera agradezco el apoyo técnico de los integrantes del laboratorio: Dr. Michael Jeziorski, Dra Stephanie Thebault, M en C. Gabriel Nava Pinto, Nut. Fernando López Barrera y de los laboratoristas Antonio Prado Galan y Daniel Mondragón Huerta.

Agradezco especialmente a las personas que hicieron más sencilla la realización de los trámites y la documentación en el doctorado: Q. Leonor Casanova Rico, María del Carmen Velásquez Rodríguez, Yolanda Orduña Cruz y Magdalena Reyes Olán del departamento de posgrado.

Asimismo, agradezco todo el apoyo a los miembros de la biblioteca del Instituto de Neurobiología: Bib. Pilar Galarza Barrios, Ignacio Caballero Navarro y Rafael Silva Cruz. De igual manera, agradezco el apoyo del MVZ. Martín García Servin. Así como de la Unidad de Proteogenómica dirigida por la Dra. Anaid Antaramián Salas y en su momento el Dr. Manuel Aguilar Ramírez. Así como la ayuda de la Ing Elsa Nydia Hernández Rios y el M en C. Leopoldo González Santos.

Este trabajo doctoral pudo llevarse a cabo gracias al apoyo brindado por el CONACyT (Becario 165474) y de la DGEP-UNAM durante el curso del doctorado y para la realización de este trabajo.

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	6
1. Regulación neuroendocrina de la reproducción.	6
2. Generalidades de las neuronas GnRHérgicas	7
2.1 Origen embrionario de las neuronas GnRHérgicas	8
2.2 Distribución anatómica de las neuronas GnRHérgicas	8
3. La línea celular inmortalizada de neuronas GnRHérgicas GT1.	9
4. Regulación aferente de las neuronas GnRHérgicas	12
5. Generalidades del ácido gama-amino butírico y sus receptores	13
6. Efecto fisiológico del GABA sobre la reproducción	16
7. Regulación GABAérgica de la secreción de la GnRH en las células GT1	18
8. Papel del AMPc en la secreción de la GnRH y la fertilidad	20
9. Generalidades de la familia de adenilato ciclasas	22
9.1 Estructura general de las adenilato ciclasas	22
9.2 Múltiples isoformas de la adenilato ciclasa	24
9.3 Mecanismos de regulación de las adenilato ciclasas	26
9.4 Distribución de las adenilato ciclasas y su función	29
Planteamiento del problema	32
Hipótesis	34
Objetivos	34
Metodología	34
1. Cultivo celular	34
2. Extracción de ARN	35
3. Retrotranscripción y la PCR	35
4. Clonación de fragmentos genómicos	37
5. PCR en tiempo real	37
6. Estudios de AMPc	37
7. Ensayo de la fosfatasa PP2B (calcineurina)	38

8. Protocolo de la transfección para el siRNA dirigido a la AC9	38
9. Ensayo de la medición de luciferasa	38
Resultados	39
1. Caracterización de la expresión del ARNm de las isoformas de la adenilato ciclasa	39
2. El GABA disminuye la acumulación del AMPc en las células GT1-7 a través de un mecanismo dependiente de canales de calcio	41
3. La disminución de la síntesis del AMPc mediada por el GABA es bloqueada por inhibidores de la calcineurina y disminuida por la inhibición de la CamKII	42
4. El GABA incrementa la actividad de fosfatasa a través de un mecanismo dependiente de canales de calcio	45
5. El GABA incrementa la expresión del ARNm de la adenilato ciclasas tipo 7 y 9	46
6. Los receptores GABA _A y GABA _B están involucrados en la regulación de la expresión del ARNm mediada por el GABA	48
7. Estandarización de la metodología para silenciar la expresión de la AC9	48
Discusión	52
Conclusiones	59
Perspectivas	60
Referencias	61

Resumen

El neurotransmisor GABA es un importante modulador de la secreción de la GnRH, y en consecuencia de la reproducción. En células GnRHérgicas inmortalizadas el GABA actúa vía receptores ionotrópicos tipo GABA_A, generando un efecto bifásico en la secreción de la GnRH. Un incremento inicial de la secreción de la GnRH es disparado por un aumento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$, mientras que un decremento progresivo de los niveles de la GnRH es acompañado por la caída en la $[AMPc]_i$. Los experimentos descritos en este trabajo fueron diseñados para explorar las posibles vías de señalización involucradas en este mecanismo novedoso de inhibición GABAérgica sobre la síntesis del AMPc en las células GT1-7. Usando la metodología de la RT-PCR y la PCR en tiempo real, hemos encontrado que las células GT1-7 expresan 8 de las 9 isoformas membranales de la adenilato ciclasa (AC) conocidas hasta el momento, incluyendo en mayor proporción a la AC3 y la AC9, así como la AC5 y la AC6, todas éstas reguladas negativamente por un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. En contraste, las isoformas de la AC que son positivamente reguladas por incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ son pobremente detectables (AC1) o indetectables (AC8). La activación farmacológica de los canales de calcio operados por voltaje tipo L con BayK 8644 produjo un decremento en la $[AMPc]_i$ similar a la inducida por el GABA, mientras que el bloqueo de estos canales de calcio con verapamil revierten el efecto del GABA en la síntesis del AMPc. Más aún, el bloqueo de la calcineurina con deltamethrin, FK-506 o ciclosporina A previno el efecto inhibitor del GABA sobre la $[AMPc]_i$ apoyando el papel de la AC9 en este efecto. Adicionalmente, bloqueando a la cinasa dependiente del complejo calcio-calmodulina tipo 2 (CamKII, por sus siglas en inglés) con KN-62 parcialmente revirtió la acción del GABA, sugiriendo que la AC3 puede estar involucrada en este efecto. Finalmente, el GABA incrementa la actividad de la fosfatasa con una modalidad dependiente del calcio, dicho efecto es bloqueado por los inhibidores de la calcineurina. En conjunto, nuestros resultados muestran que la acción del GABA a través de la activación de los receptores GABA_A pueden disminuir la actividad de las neuronas GnRHérgicas inmortalizadas, y que el efecto del GABA parece ser mediado por un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ seguido por la activación de la calcineurina y la CamKII, produciendo una desfosforilación de la AC9 y la fosforilación de la AC3 respectivamente, y la subsecuente reducción de la síntesis del AMPc.

Abstract

The neurotransmitter GABA is an important modulator of GnRH, and consequently of reproduction. GABA, acting via ionotropic GABA_A receptors, exerts a biphasic effect on GnRH secretion in immortalized GnRH cells. The initial increase in GnRH secretion is triggered by a sharp rise in $[Ca^{2+}]_i$, while the progressive decline of GnRH levels that follows is paralleled by reduced levels of intracellular cAMP. The experiments described here were designed to explore the potential signaling pathways involved in this novel GABA_A ionotropic inhibition of cAMP synthesis in GT1-7 cells. Using RT-PCR and real time PCR, we found that GT1-7 cells express 8 of 9 known membrane adenylyl cyclase (AC) isoforms, including a large proportion of AC3 and AC9, as well as AC5 and AC6, all of which are negatively regulated by increases in $[Ca^{2+}]_i$. In contrast, isoforms of AC that are positively regulated by $[Ca^{2+}]_i$ were barely detectable (AC1) or undetectable (AC8). Pharmacological activation of L-type voltage-operated calcium channels with BayK 8644 produced a decrease in $[cAMP]_i$ similar to that induced by GABA, while blocking these calcium channels with verapamil reversed the effect of GABA on cAMP synthesis. Furthermore, blocking calcineurin with deltamethrin, FK-506 or cyclosporin A blocked the inhibitory effect of GABA on $[cAMP]_i$, supporting the involvement of AC9 in this effect. In addition, blocking Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CamKII) with KN-62 partially reversed the action of GABA, suggesting that AC3 may also be involved in this effect. Finally, GABA increased phosphatase activity in a calcium-dependent manner, an effect blocked by calcineurin inhibitors. Collectively, our results show that the ionotropic action of GABA via the activation of GABA_A receptors can decrease AC activity in immortalized GnRH neurons, and that the effect of GABA appears to be mediated by a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ followed by activation of calcineurin and CamKII, leading to dephosphorylation of AC9 and phosphorylation of AC3 respectively, and subsequently reducing the synthesis of cAMP.

Introducción

En los mamíferos, la regulación de la función reproductiva es un proceso complejo de integración de señales emitidas por el hipotálamo, la adenohipófisis y las gónadas. Este eje reproductivo está organizado de forma jerárquica, donde la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) es la señal clave para la orquestación de la fertilidad. La función reproductiva requiere de una estrecha regulación de las neuronas GnRHérgicas mediada a través de diversos neurotransmisores incluyendo al ácido γ -amino butírico (GABA). Por estudios neuroanatómicos se han identificado sinapsis GABAérgicas en las neuronas GnRHérgicas (Jennes *et al.*, 1983 y Pompolo *et al.*, 2003) y se encontró que estas neuronas expresan receptores del tipo GABA_A (Jung *et al.*, 1998; Pape *et al.*, 2001; Todman *et al.*, 2005) que son funcionales (Spergel *et al.*, 1999).

En las últimas décadas se ha mostrado que el GABA tiene efectos fisiológicos tanto inhibidores como facilitadores sobre el eje reproductivo, incluyendo efectos directos en las neuronas GnRHérgicas. Estudios realizados principalmente en roedores y ovejas sugieren una acción predominantemente inhibitoria del GABA sobre las neuronas GnRHérgicas mostrando que la aplicación de antagonistas de los receptores GABA_A incrementa la liberación de la LH (Lamberts *et al.*, 1983; Adler y Crowley., 1986; Ferreira *et al.*, 1998). Además, existe una relación inversa entre los niveles del GABA y la secreción de la GnRH en mediciones realizadas en el área preóptica (Jarry *et al.*, 1988; Robinson *et al.*, 1991; Herbison y Dyer., 1991) y la administración de antagonistas de los receptores GABA_A en el tercer ventrículo adelanta el inicio de la pubertad en monos rhesus (Keen *et al.*, 1999). En contraste, el GABA también tiene influencia fisiológica estimulando al eje reproductivo, al inducir una excitación rápida en las neuronas GnRHérgicas (Han *et al.*, 2002; DeFazio *et al.*, 2002; Moenter y DeFazio *et al.*, 2005) y la liberación de la LH (Bilger *et al.*, 2001). Además, se ha mostrado que el GABA produce la hiperpolarización de las neuronas GnRHérgicas (DeFazio *et al.*, 2002; Moenter y DeFazio., 2005) mediante la activación de los receptores al GABA_A al utilizar al agonista muscimol (DeFazio *et al.*, 2002).

Aún cuando es evidente el papel fisiológico del GABA en la reproducción, permanece elusivo el efecto directo del GABA sobre las neuronas GnRHérgicas. El estudio de estas neuronas se ha dificultado debido a que son una población escasa con 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 y/o bien de manera indirecta involucrando inter-neuronas aferentes a éstas. Además, estas características anatómicas dificultan la identificación del origen de las aferencias a las neuronas GnRHérgicas.

Actualmente está disponible una línea celular de neuronas secretoras de la GnRH (células GT1) que comparte numerosas características con las neuronas GnRHérgicas *in vivo* (Mellon *et al.*, 1990) y permite estudiar a los mecanismos de señalización involucrados en la compleja regulación de la liberación de la GnRH. En esta línea celular, el GABA produce un efecto bifásico de la secreción de este neuropéptido (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994), que consiste en una fase inicial de activación transitoria y una fase sostenida de inhibición tardía. La primera está caracterizada por un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por la apertura de canales de calcio operados por voltaje tipo L (COVL) (Sun *et al.*, 1997). La fase tardía se caracteriza por una disminución sostenida en la secreción de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994) y en los niveles de la $[AMPC]_i$ (Beltrán-Parrázal *et al.*, 2001).

El evento de estimulación inicial es consecuencia de la activación de los receptores $GABA_A$ que genera un flujo saliente de cloro resultando en la despolarización de la membrana y aumentando la excitación celular (DeFazio *et al.*, 2002). Las neuronas GnRHérgicas *in situ* y la línea celular GT1 mantienen niveles elevados de $[Cl^-]_i$ debido a la homeostasis del cloro mediada por 2 cotransportadores. Esto se explica por la actividad aumentada del cotransportador de $Na^+/K^+/2Cl^-$ (NKCC-1) que favorece la acumulación intracelular de este anión. En contraste, el cotransportador que extruye el cloro al estar acoplado a potasio (KCC-2, por sus siglas en inglés) tiene menor actividad. En conjunto, existe un balance a favor de la acumulación de la $[Cl^-]_i$ (DeFazio *et al.*, 2002).

Por lo tanto, la activación de los receptores a GABA_A genera un flujo saliente de cloro que resulta en una despolarización e induce la apertura de canales de calcio operados por voltaje tipo L (CCOVL), lo que aumenta de forma transitoria la concentración intracelular del calcio ($[Ca^{2+}]_i$) (Sun *et al.*, 1997). Esto produce un episodio único de liberación de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). La fase inicial de estimulación del GABA es seguida por un decremento prolongado de la secreción de la GnRH y es acompañada, en paralelo, por la reducción persistente de los niveles intracelulares de la adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) y de la excitabilidad celular (Beltran-Parrazal *et al.*, 2001). Todos estos efectos tardíos, incluyendo el decremento persistente del AMPC, son producidos por los agonistas de GABA_A y bloqueados por el uso de antagonistas (Beltran-Parrazal *et al.*, 2001).

En este trabajo, encontramos que el incremento transitorio del calcio era capaz de mimetizar la disminución prolongada en la síntesis del AMPC mediada por el GABA en las células GT1. Además, determinamos que las células GT1 expresan subtipos de la AC que son inhibidos por el calcio, incluyendo a la AC9 cuya actividad es disminuida por la desfosforilación mediada por la fosfatasa dependiente de calcio denominada calcineurina, también conocida como PP2B (Antoni *et al.*, 1995; Antoni *et al.*, 1998; Paterson *et al.*, 2000). Además encontramos que la movilización del calcio -similar a la inducida por el GABA- es capaz de disparar una reducción duradera de los niveles del AMPC en las células GT1-7. Más aún, la inhibición del AMPC mediada por el GABA fue bloqueada o reducida por la calcineurina y la cinasa dependiente del complejo calcio-calmodulina tipo II (CamKII), respectivamente. En consecuencia, la calcineurina/AC9 y la CamKII/AC3 están implicadas en la cascada de regulación. Asimismo, demostramos que el GABA incrementa la tasa de desfosforilación mediada por la calcineurina en las células GT1-7.

Antecedentes

1. Regulación neuroendocrina de la reproducción.

La fertilidad está finamente regulada puesto que el éxito reproductivo es esencial para la perpetuación de la especie. Evolutivamente, los vertebrados han desarrollado la capacidad de evaluar su entorno para asegurar al máximo la supervivencia de las crías. Por lo tanto, la fertilidad es influida por factores tanto externos como internos. La información externa está representada fundamentalmente por diversas señales medioambientales entre las que resaltan las fotoperiódicas, así como señales emitidas por individuos del género opuesto, la presencia de depredadores y la disponibilidad del alimento. Entre las modalidades de la función interna están las asas de retroalimentación de las hormonas esteroideas, así como la información sobre el balance metabólico y emocional. Este cúmulo de señales es percibido por el sistema nervioso central (SNC), en donde es integrado y la resultante de esta información accede al eje reproductor a través de vías aferentes sinápticas que involucran neuromediadores de naturaleza muy diversa (Martínez de la Escalera *et al.*, 2004).

El eje neuroendócrino reproductor es la vía final de salida que modula finamente la fertilidad. Este eje está conformado por el hipotálamo, la adenohipófisis o pituitaria y las gónadas (HPG). El eje HPG tiene una organización jerárquica y cada nivel del eje sintetiza y libera hormonas (Figura 1). En el hipotálamo se encuentra una población escasa de neuronas que secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés). Esta hormona es un decapeptido que se secreta de forma pulsátil a la eminencia media. La GnRH es transportada por la circulación portal que está conformada por 2 plexos capilares que comunican al hipotálamo con la glándula hipófisis anterior. En la adenohipófisis, la GnRH se une a su receptor localizado en los gonadotropos para estimular la síntesis y secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH). Estas hormonas en conjunto son nombradas gonadotropinas y emulan la secreción episódica de la GnRH. Las gonadotropinas viajan por la circulación sistémica hasta alcanzar a las gónadas en donde modulan la gametogénesis y la producción de hormonas esteroideas que comprenden a los estrógenos, las progesteronas y los andrógenos (Fink 2000; Gore 2002).

Aunque cada nivel del eje HPG es crítico para la función reproductiva, la GnRH es el regulador primario del sistema entero. Esto se debe en parte a que la hormona está altamente conservada a lo largo de la escala filogenética y a que en la ausencia de las neuronas GnRHérgicas nunca ocurre la maduración reproductiva, salvo que se estimule el resto del eje HPG de forma exógena (Plant y Barker-Gibb, 2004; Ojeda *et al.*, 2006).

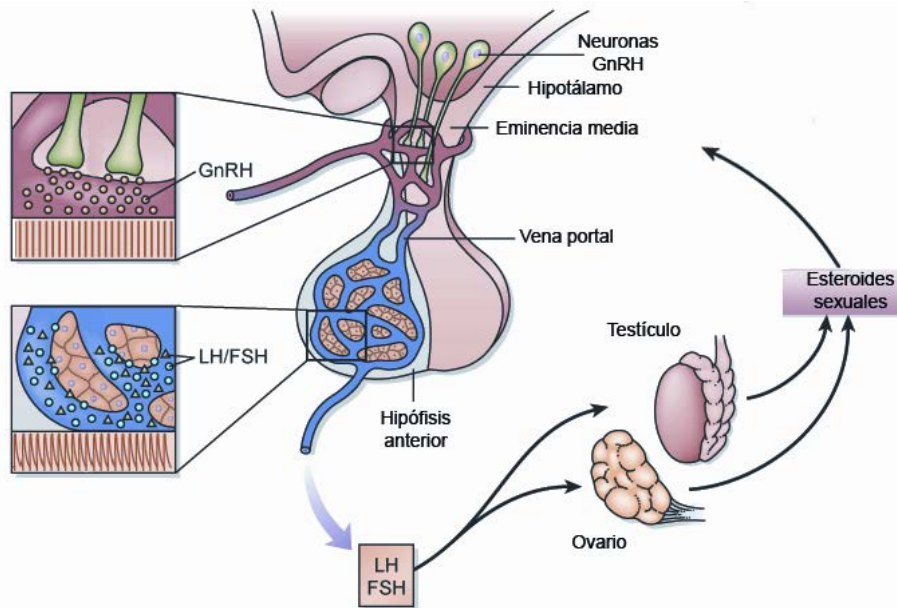


Figura 1: Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. La GnRH es liberada a la eminencia media para ser conducida a la adenohipófisis donde estimula la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH). Estas gonadotropinas a su vez, inducen la maduración de gametos y la biosíntesis de esteroides provenientes de las gónadas. Modificado de: Nature Neuroscience 2004;7:1040-1047.

2. Generalidades de las neuronas GnRHérgicas

La función reproductiva es modulada a nivel del SNC por un escaso número de neuronas secretoras de la hormona GnRH que tienen una distribución difusa a lo largo del hipotálamo (Wray *et al.*, 1989). A diferencia del resto de las neuronas hipotalámicas, las neuronas GnRHérgicas tienen su origen fuera del hipotálamo y migran para alcanzar su destino final durante la embriogénesis (Tobet *et al.*, 2001; Bless *et al.*, 2005). Durante la infancia permanece silente la secreción de la GnRH y el aumento en la frecuencia y la amplitud de la secreción de la GnRH establece la pubertad (Terasawa y Fernandez., 2001). En la edad adulta, la secreción pulsátil de este neuropéptido modula la fertilidad (Dierschke *et al.*, 1970; Belchetz *et al.*, 1978).

2.1 Origen embrionario de las neuronas GnRHérgicas

Las células precursoras de las neuronas GnRHérgicas se diferencian en etapas tempranas del desarrollo 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; Tobet *et al.*, 2006). Las neuronas GnRHérgicas forman 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 y 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 (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 (MacColl *et al.*, 2002). 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).

2.2 Distribución anatómica 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 Broca, 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 (Silverman *et al.*, 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 y 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 a 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 y la presencia bien definida del espacio sináptico. Además, se mostró el agrupamiento de vesículas secretoras en la presinapsis y especializaciones membranales en los extremos pre y postsinápticos (Witkin y Silverman., 1985; Leranth *et al.*, 1985). Además se ha encontrado que las neuronas GnRHérgicas tienen dendritas primarias largas (hasta 1500 μm) que están cubiertas de espinas que sugieren la presencia de abundantes aferencias que participan en la integración neuronal dentro de la red de neuronas GnRHérgicas (Campbell *et al.*, 2005).

3. La línea celular inmortalizada de neuronas GnRHérgicas GT1.

El estudio de las neuronas GnRHérgicas a nivel molecular y celular es problemático debido a sus características anatómicas, ya que se trata de una población neuronal escasa y con una distribución difusa. Para tratar de resolver estas limitaciones técnicas, se generó una línea celular inmortalizada de las neuronas GnRHérgicas denominada GT1. Esta línea celular fue desarrollada por Mellon y sus colaboradores (Mellon *et al.*, 1990), y a la fecha es un modelo ampliamente aceptado para el estudio de mecanismos moleculares asociados a la secreción de la GnRH. El abordaje utilizado consistió en inducir genéticamente la formación de un tumor de neuronas GnRHérgicas. Para este fin se construyó un gen híbrido mediante 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 CB6F₁/J (C57BI/6J X BALB/cJ). Los embriones fueron implantados en un hembra pseudoembarazada y se obtuvieron 9 ratones transgénicos que fueron infértiles.

Tanto en hembras como en machos se observó que las gónadas y los órganos 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 GT1-1, GT1-3 y GT1-7. 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 GT1-3 y GT1-7 duplican su población en 36 horas y la clona GT1-1 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; Weiner *et al.*, 1992), las células GT1 hacen contactos sinápticos entre ellas (Mellon *et al.*, 1990; Weiner *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 GT1 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), como en las células GT1 (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 GT1 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 periodicidad 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 GT1 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.

4. Regulación aferente de las neuronas GnRHérgicas

Las señales ambientales, metabólicas y emocionales relevantes para la función reproductiva son percibidas por el SNC donde esta información es integrada y enviada a las neuronas GnRHérgicas. Esta información es codificada a través de vías aferentes sinápticas que involucran a múltiples neurotransmisores y hormonas. Por lo tanto, las neuronas GnRHérgicas conforman la vía final de salida al eje reproductor. Si bien, la liberación pulsátil de la GnRH es una propiedad intrínseca de las neuronas GnRHérgicas tanto *in vivo* (Belchetz *et al.*, 1978) como *in vitro* (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992a), esta periodicidad es moldeada por varios neurotransmisores, incluyendo a la norepinefrina, dopamina, histamina, acetilcolina, glutamato y GABA, entre otros.

Como ya se mencionó, 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 éstas. 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 GT1, lo cual permite explorar el efecto directo de cada neurotransmisor y las vías de señalización involucradas en este efecto. En el presente trabajo nos enfocamos en estudiar a la vía de señalización intracelular del GABA en las neuronas GnRHérgicas. A continuación se discutirán generalidades de este neurotransmisor y sus receptores.

5. Generalidades del ácido gama-amino butírico y sus receptores

El ácido γ -amino butírico es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia en el sistema nervioso central (SNC). Este neurotransmisor es sintetizado a partir del glutamato por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) que requiere del piridoxal fosfato como cofactor. El glutamato es sintetizado a partir de α -cetoglutarato por la enzima transaminasa del α -cetoglutarato (GABA-T) entre otras. El GABA es transformado en ácido succínico por la GABA-T y la dehidrogenasa del semialdehído succínico (Nichols *et al.*, 2001).

La ruta alternativa del metabolismo de carbohidratos y el ciclo de Krebs (Figura 2) así como la expresión de GAD se presenta exclusivamente en neuronas que sintetizan GABA. Varias regulaciones adicionales en la síntesis de GABA han sido identificadas en mamíferos, incluyendo el ATP, el fosfato inorgánico, y el cofactor piridioxal fosfato (PLP) (Nichols *et al.*, 2001).

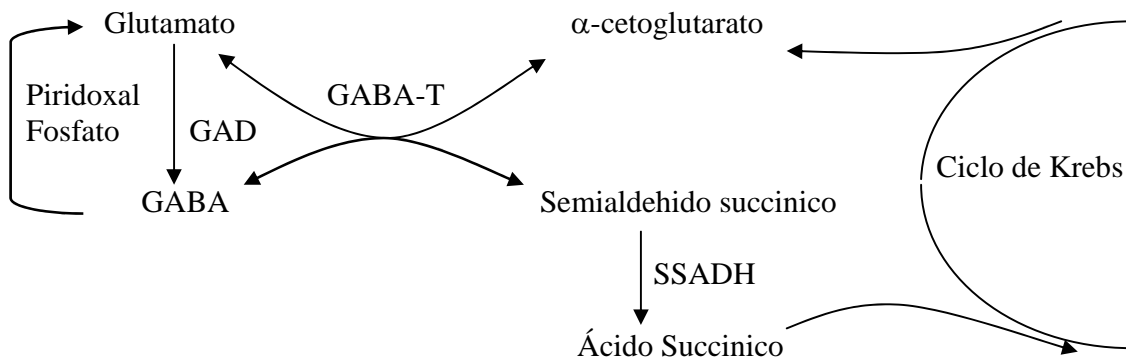


Figura 2: Síntesis y degradación de GABA por una vía alternativa del metabolismo de carbohidratos.

Existen dos formas de GAD: GAD₆₇ con alta afinidad al PLP y podría ser constitutivamente activa; la GAD₆₅ tiene baja afinidad al PLP, y su actividad puede ser rápidamente regulada por la disponibilidad del cofactor. Al realizar knockout de GAD₆₇ se muestra una reducción substancial de GABA en el cerebro produciendo la muerte poco después de nacer. En cambio en GAD₆₅ muestra niveles normales de GABA, pero esta ligeramente más predispuesto a padecer de convulsiones (Nichols *et al.*, 2001). Se especula que el GABA es metabolizado en los sitios interneuronales o en las neuronas post-sinápticas. Tanto GAD como GABA-T son dependientes de la coenzima PLP, por lo que no es de extrañar que el efecto en esta coenzima se vea reflejado en el contenido de GABA en el cerebro. La dehidrogenasa del semialdehído succínico (SSDH) tiene una alta especificidad al sustrato y puede distinguirse de la aldehído deshidrogenasa no específica encontrada en el cerebro (Nichols *et al.*, 2001).

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_A y GABA_C son canales permeables al ión cloro que son activados por este neurotransmisor. El tercer receptor GABAérgico, denominado GABA_B, 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 (Bowery y Smart, 2006).

En mamíferos, los receptores GABA_A son heteropentámeros. Hasta el momento se han identificado las siguientes subunidades: α (1-6), β (1-3), δ (1-3), γ (1) y ϵ (1). Cada una de las subunidades está conformada por un largo extremo amino-terminal extracelular y 4 dominios transmembranales que forman un canal iónico selectivo al cloro que está constituido principalmente por la combinación de las subunidades α , β y γ (Kardos, 1999). De forma distintiva los efectos inhibidores del GABA a corto plazo son mediados por los receptores ionotrópicos GABA_A. La homeostasis del cloro es un elemento clave en la acción del GABA sobre la excitabilidad celular debido a que los receptores GABA_A son canales de cloro que se activan al unirse a su ligando (Simeone *et al.*, 2003). En la mayoría de las neuronas maduras se mantiene una $[Cl^-]_i$ cercana a 10 mM (Owens y Kriegstein, 2002) la cual favorece la entrada de este anión y genera una hiperpolarización de la membrana que disminuye la excitabilidad neuronal (Ganguly *et al.*, 2001). Sin embargo, el GABA también tiene un efecto excitador en el hipotálamo embrionario y neonatal (Ganguly *et al.*, 2001), así como en algunas poblaciones neuronales adultas (Vardi *et al.*, 2000, Martina *et al.*, 2001; De Jeu y Pennartz, 2002, Moenter y DeFazio, 2005). Esto se debe al aumento en la acumulación del cloro intracelular (25 mM) (Owens y Kriegstein, 2002).

La $[Cl^-]_i$ depende de un equilibrio muy delicado entre la entrada y la salida del cloro que es mediada principalmente por 2 cotransportadores denominados NKCC1 y KCC2 (Fiumelli y Woodin, 2007) que tienen una profunda influencia en la neurotransmisión mediada por el GABA en el SNC. Estos cotransportadores son eléctricamente neutrales (catión/cloro).

El cotransportador NKCC1 es permeable a la siguiente proporción de iones: $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ generando un gradiente electroquímico del sodio que favorece la entrada de cloro a la célula y su respectiva acumulación. En contraste, el cotransportador KCC2 es específico del linaje neuronal y el gradiente electroquímico generado por el potasio facilita la salida del cloro. En consecuencia, la abundancia en la expresión y actividad de cada uno de estos cotransportadores en la célula define la dirección del flujo de cloro a través de los canales selectivos a este catión, y por ende, influye sobre la excitabilidad celular y la probabilidad de generar potenciales de acción. Se ha propuesto que en etapas tempranas del desarrollo la acción estimuladora del GABA actúa como un factor trófico que permite el establecimiento de redes neuronales (Owens y Kriegstein., 2002). En las neuronas embrionarias, la despolarización de la membrana mediada por el GABA es registrada por los canales de calcio operados por voltaje generando la entrada transitoria de calcio que es suficiente para activar vías de señalización dependientes de este segundo mensajero (Owens y Kriegstein., 2002).

El receptor GABA_A puede ser activado por muscimol e isoguvacina, y es bloqueado por bicuculina, picrotoxina, gabacina (SR95531) y (+) β -hidrastina (Bormann., 2000). De igual manera, este receptor está modulado alostéricamente por barbituratos benzodiazepinas, etanol y esteroides (Bormann., 2000). Por otro lado, el receptor GABA_B se identificó al observar una respuesta lenta inhibidora de la acción del GABA. El receptor GABA_B activa a las proteínas G modulando la producción de segundos mensajeros. Además, los receptores GABA_B 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_B es un heterodímero que puede estar constituido por la combinación de las subunidades: $\text{GABA}_{B(1a)}$, $\text{GABA}_{B(1b)}$ y $\text{GABA}_{B(2)}$ (Hammond., 2001). El receptor GABA_B es activado por el baclofen y el ácido fosfínico (SKF 97541), y son bloqueados por el faclofen, el saclofen y el CGP64213 (Chebib y Johnston., 1999; Bormann., 2000).

Recientemente se ha descrito un tercer subtipo de receptor denominado GABA_C que al igual que el receptor GABA_A es de tipo ionotrópico, pero que presenta una secuencia distinta. Hasta el momento se han identificado 3 subunidades del receptor GABA_C (ρ_{1-3}) que son ensambladas en homooligómeros o pseudooligómeros (ρ_{1-2}) (Chebib y Jonhston., 1999). Los receptores GABA_A y GABA_C presentan alta selectividad por el cloro y un tamaño de poro similar. Sin embargo, el receptor GABA_C es alrededor de 10 veces más sensible al GABA que el receptor GABA_A y presenta una débil desensibilización, aún frente a altas concentraciones del agonista (Woodward *et al.*, 1992; Bormann., 2000). El receptor GABA_C 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 (Woodward *et al.*, 1992; Feigenspan., 1998).

6. Efecto fisiológico del GABA sobre la reproducción

Las neuronas GnRHérgicas son moduladas tanto por vías aferentes sinápticas como por acción de la glía (Terasawa y Fernandez, 2001). La acción de la glía es predominantemente estimuladora (Ojeda *et al.*, 2001) mientras que las aferentes sinápticas tienen componentes tanto excitadores como inhibidores. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC y participa en casi el 50% de los contactos sinápticos en el hipotálamo (Decavel y van den pol., 1990). La mayoría de los efectos del GABA sobre las neuronas GnRHérgicas involucran la acción de los receptores GABA_A y muestran tanto efectos estimuladores como inhibidores. Se ha demostrado que el GABA juega un papel fundamental en la fisiología de la reproducción. Durante el desarrollo embrionario las neuronas GnRHérgicas tienen su origen fuera del sistema nervioso central en la placa olfatoria y migran hacia el hipotálamo anterior y el área preóptica media (Schwanzel-Fukuda y Pfaff., 1989). Durante esta migración se ha observado que las neuronas GnRHérgicas embrionarias expresan a la GAD67, que es la enzima que sintetiza al GABA (Bless *et al.*, 2000). El uso de antagonistas de los receptores GABA_A producen una migración desorganizada debido a que las neuronas GnRHérgicas pierden contacto con el nervio vomeronasal que funciona como guía durante la migración (Bless *et al.*, 2000).

Una vez que las neuronas GnRHérgicas entran al cerebro, cesa la producción de GABA en estas neuronas, sugiriendo que ya no se requiere la fuente de GABA endógeno para continuar su migración hacia el hipotálamo y que de continuar su producción podría alterar la fertilidad. Para probar esta hipótesis generaron ratones transgénicos que presentan una sobreproducción del GABA en las neuronas GnRHérgicas y evaluaron la función reproductiva. Inicialmente estos animales alcanzan la pubertad normalmente pero posteriormente las hembras mostraron un menor número de crías por camada, además de alteraciones en el ciclo ovárico espaciando los embarazos y finalmente una vida reproductiva de menor duración en comparación con los animales silvestres (Heger *et al.*, 2003). Las vías aferentes específicas a las neuronas GnRHérgicas son pobremente entendidas por 2 razones. Primero, los cuerpos celulares están distribuidos de forma difusa; y segunda, este grupo celular también dan lugar a un número de vías extra-hipotalámicas al órgano subfornical, al órgano vasculoso de la lamina terminalis (OVLT), la amígdala, la habénula y los cuerpos mamilares (Witkin *et al.*, 1982; Witkin y Silverman, 1985).

En primates no humanos el sistema neurosecretor de la GnRH se mantiene activo durante el periodo neonatal y posteriormente permanece en un estado latente hasta la etapa juvenil o prepuberal (Terasawa y Fernandez, 2001). El aumento en la secreción de la GnRH es indispensable para el establecimiento de la pubertad. Se ha propuesto que el GABA ejerce un tono inhibitorio que es responsable de restringir la liberación de la GnRH durante la infancia (Mitsushima *et al.*, 1994). Por medio de experimentos realizados en monos rhesus hembras se ha demostrado que la remoción del tono inhibitorio del GABA facilita el inicio de la pubertad (Keen *et al.*, 1999; Kasuya *et al.*, 1999). En general, los estudios *in vivo* realizados en roedores son consistentes con este concepto. En adultos, la liberación del GABA en el área preóptica disminuye antes de que se genere el pico preovulatorio de LH (Jarry *et al.*, 1992), y el uso de antagonistas de los receptores GABA_A en la mañana del proestro adelanta el tiempo en que se presenta el pico preovulatorio de LH (Mitsushima *et al.*, 1997; Mitsushima *et al.*, 2002). En contraste, la infusión intra-hipotalámica del GABA durante período previene el pico preovulatorio de LH (Lamberts *et al.*, 1983; Herbison y Dyer., 1991).

En humanos se ha sacado provecho de este efecto inhibitor dependiente del GABA al utilizar agonistas del GABA para detener el progreso de la pubertad precoz (Bourguignon *et al.*, 1991). Otros estudios han mostrado que la infusión del GABA en el tercer ventrículo aumenta la liberación de la LH (Ondo., 1974; Vijayan y McCann., 1978). Asimismo, la exposición del GABA en la eminencia media de la rata evoca la secreción de la GnRH (Masotto *et al.*, 1989).

7. Regulación GABAérgica de la secreción de la GnRH en las células GT1

En estudios realizados *in vitro* utilizando a la línea celular inmortalizada de neuronas GnRHérgicas (GT1) se encontró que el GABA produce un efecto bifásico sobre la secreción de la GnRH. Este efecto se caracteriza por una fase inicial de activación que dura apenas unos minutos en donde se incrementa la liberación de la GnRH y que es seguida por una fase tardía de inhibición, donde disminuye la secreción de este neuropéptido por un período de varias decenas de minutos (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994) (Figura 3).

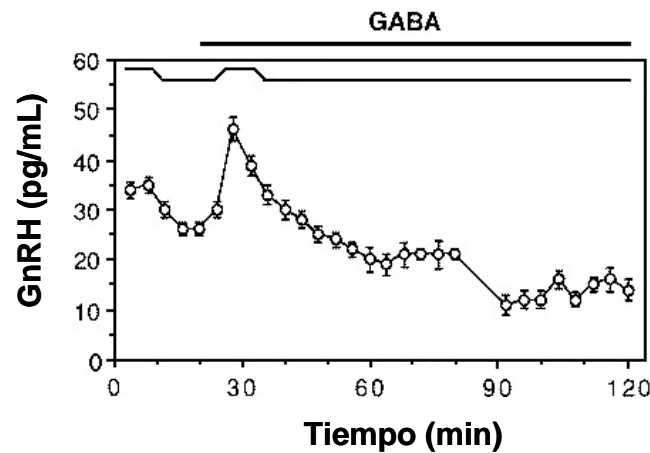


Figura 3: Efecto bifásico del GABA sobre la secreción de la GnRH. Se presenta una fase inicial de activación en la cual el GABA induce un pulso único de secreción de la GnRH y este es seguido por un período prolongado de inhibición de la secreción de la GnRH. (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994).

A pesar de que el GABA es reconocido como el principal neurotransmisor inhibitor en el SNC, existen datos de que las neuronas embrionarias (Ganguly, *et al.* 2001) y algunas poblaciones neuronales adultas (Martina *et al.*, 2001; De Jeu y Pennartz 2002; Marty y Llano, 2005) son excitadas por la acción del GABA.

En la línea celular inmortalizada GT1 (Hales, *et al.* 1994; Martínez de la Escalera *et al.*, 1994) y en neuronas GnRHérgicas adultas *in situ* (DeFazio, *et al.* 2002) se presenta una fase inicial de activación de corta duración generada por la estimulación de los receptores GABA_A (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994; Hales *et al.*, 1994). La dirección del flujo del cloro en respuesta a la activación de los receptores GABA_A depende del potencial de membrana, y de la concentración intracelular de cloro que es modulada por mecanismos de homeostasis mediados por cotransportadores (Kaila, 1994). En la mayoría de las neuronas maduras, la baja concentración de cloro intracelular (<10 mM) se mantiene por medio del cotransportador de cloro y potasio (KCC-2) y el canal de cloro activado por hiperpolarización (CLC-2), ya que ambos disminuyen la concentración de cloro intracelular. En contraste, el cotransportador de sodio, potasio y cloro (NKCC-1) media la acumulación del cloro intracelular (DeFazio, *et al.* 2000; Lu, *et al.*, 1999).

En las células GT1-7 y las neuronas GnRHérgicas *in situ*, se ha descrito la ausencia de los cotransportadores que inducen la salida de cloro (KCC-2 y CLC-2), y la presencia del cotransportador NKCC-1 que acumula a este anión (DeFazio, *et al.* 2002). Por lo tanto, en las células GT1-7 el potencial de equilibrio electroquímico del cloro es menos negativo que el potencial de reposo de la membrana plasmática, en consecuencia, la apertura del receptor-canal GABA_A produce una despolarización que activa a su vez a canales de calcio tipo L dependientes de voltaje (Hales, *et al.* 1994; Sun, *et al.* 1997). El incremento en la [Ca²⁺]_i dispara un episodio único de secreción de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). A pesar de que se ha caracterizado detalladamente la fase inicial de activación producida por el GABA, poco se conoce sobre la fase tardía de inhibición. Esta fase de inhibición se caracteriza por la disminución en la secreción de la GnRH y el decremento en la [Ca²⁺]_i, hasta alcanzar niveles menores a los basales en ambos parámetros que perdura por varias decenas de minutos (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1997). Además, se ha descrito que el GABA genera una caída en la [AMPC]_i de forma dosis-dependiente que perdura por al menos 30 minutos (Beltran-Parrazal, *et al.* 2001).

8. Papel del AMPc en la secreción de la GnRH y la fertilidad

El AMP cíclico (AMPc) es un segundo mensajero ampliamente caracterizado y se ha demostrado que influye sobre la secreción de la GnRH. En la línea celular GT1 se encontró que la $[AMPc]_i$ y la secreción de la GnRH se elevan de forma dosis-dependiente por efecto de la dopamina y la noradrenalina (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992b; Martínez de la Escalera *et al.*, 1992c). De igual manera la administración farmacológica de la forskolina y el 8-Br-AMPc mimetizan la liberación de la GnRH por dopamina y noradrenalina (Martínez de la Escalera *et al.*, 1995). En contraste, se ha demostrado que cuando disminuyen la $[AMPc]_i$ también disminuye la secreción pulsátil de la GnRH tanto en las células GT1-7 como en los niveles séricos de las ratas transgénicas GPR-4 (Yoshida *et al.*, 2003; Paruthiyil *et al.*, 2002).

La línea transgénica de ratas GPR-4 expresa una forma constitutivamente activa de la fosfodiesterasa PDE4D1 (enzima que degrada al AMPc) y fue genéticamente dirigida a las neuronas GnRHérgicas mediante el empleo del promotor de la GnRH (Paruthiyil *et al.*, 2002). Las ratas GPR-4 se caracterizan por presentar una pérdida prematura de la fertilidad, anovulación y desarrollo de ovarios poliquísticos. Además se encontró que estos animales presentaban a largo plazo (9 meses de edad) una desregulación del balance de energía al aumentar los niveles circulantes de insulina y leptina así como la acumulación de grasa abdominal (Gomez *et al.*, 2005).

En nuestro laboratorio se demostró que existe una correlación inversa entre el GABA liberado y la $[AMPc]_i$ en la línea celular GT1-7. De tal forma que el GABA genera una caída en la $[AMPc]_i$ que es dosis dependiente y que se vuelve significativa a partir de los primeros 5 minutos de tratamiento y permanece por al menos 30 minutos (Figura 4, Beltran-Parrazal., *et al.* 2001). En conjunto, los antecedentes previamente mostrados y estos resultados sugieren fuertemente que el GABA podría inhibir la secreción de la GnRH mediante la disminución de la $[AMPc]_i$.

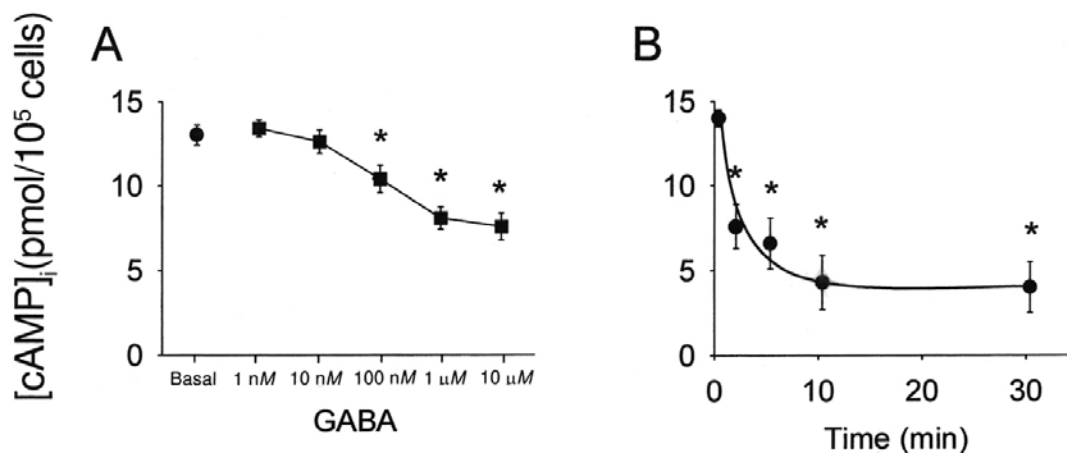


Figura 4: Efecto del GABA sobre el contenido del AMPc en las células GT1-7. A) El GABA disminuye la acumulación del AMPc en un período de 30 minutos de forma dosis dependiente. B) Curso temporal en el cual el GABA (10 μ M) genera la inhibición de la formación del AMPc. (Beltran-Parrazal *et al.*, 2001).

La caída en los niveles del AMPc puede ser explicada por una alteración en el balance entre la síntesis y degradación de este mensajero. Por un lado esto puede deberse al aumento en la actividad de degradación del AMPc por la familia de las fosfodiesterasas (PDE) y/o por una disminución en la síntesis del AMPc mediada por la familia de las adenilato ciclasas (AC). En los experimentos descritos previamente se utilizó a un inhibidor de las fosfodiesterasas (IBMX, 3-isobutil-1-metilxantina) que evita que se degrade el AMPc, por lo tanto, sugiere que la caída en los niveles en la [AMPc]_i se relaciona a la disminución en la actividad de las ACs (Beltrán-Parrazal., *et al.* 2001). Sin embargo, queda por determinar si las fosfodiesterasas también juegan un papel en esta caída en la acumulación del [AMPc]_i. Actualmente, se conocen al menos 9 isoformas de la AC que son reguladas de forma general por receptores acoplados a proteínas G, cambios en el calcio intracelular y por su fosforilación (Sunahara y Taussig., 2002).

La explicación más evidente sobre el mecanismo de acción del GABA supondría la participación del receptor GABA_B, debido a que es un receptor metabotrópico acoplado a las proteínas G y que puede modular negativamente a las adenilato ciclasas (Billinton *et al.*, 2001). Sin embargo, el uso del baclofen (agonista del receptor GABA_B) no mimetizó el efecto del GABA (figura 5), y en cambio se encontró que el muscimol (agonista del receptor GABA_A) produce una disminución dosis-dependiente de la acumulación del AMPc.

Para corroborar este efecto se administró GABA de forma concomitante con dosis crecientes de bicuculina (antagonista del receptor GABA_A), lo cual restableció la [AMPC]_i (Figura 5), reforzando la conclusión de que la disminución en la [AMPC]_i estaba siendo mediado por el receptor ionotrópico GABA_A.

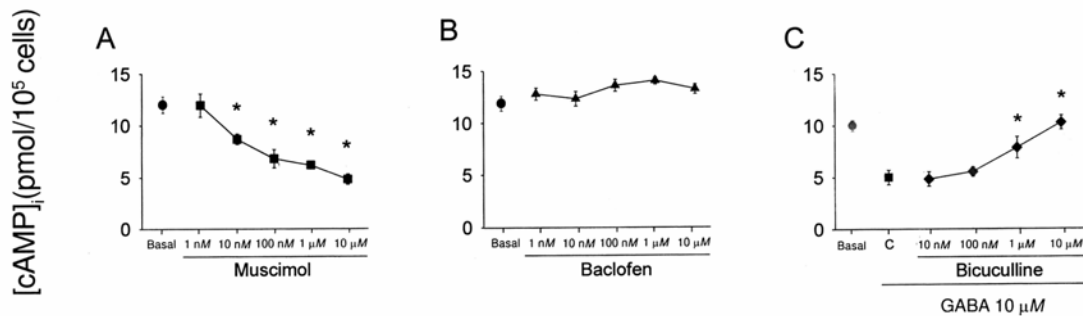


Figura 5: Acción del GABA sobre los niveles del AMPc. El muscimol (agonista del receptor GABA_A) disminuye la [AMPC]_i A), mientras que el baclofen (agonista del receptor GABA_B) carece de efecto sobre los niveles de este segundo mensajero B). Por último, se muestra que dosis crecientes de bicuculina (antagonista del receptor GABA_A) revierte la caída en la [AMPC]_i inducida por el GABA C). (Beltran-Parrazal *et al.*, 2001).

9. Generalidades de la familia de adenilato ciclasas

La enzima adenilato ciclasa (liasa del ATP-pirofosfato, EC 4.6.1.1.) tiene como función convertir al ATP en AMPc y un grupo pirofosfato, utilizando al magnesio como cofactor (Dessauer y Gilman, 1996). En los mamíferos, se han identificado y caracterizado 9 isoformas de la AC que se encuentran adosadas a la membrana plasmática y una forma soluble. La actividad de estas isoformas de la AC es regulada o modulada por una diversidad de señales, incluyendo a las proteínas G, a algunas cinasas y a fosfatasas, así como al calcio y al complejo calcio-calmodulina.

9.1 Estructura general de las adenilato ciclasas

El análisis de la estructura primaria revela que las ACs son proteínas integrales de la membrana plasmática con una masa molecular aproximada de 120-150 kDa (Tesmer y Sprang, 1998). Esta estructura sufre diversas modificaciones postraduccionales, incluyendo fosforilación (Iwami *et al.*, 1995; Zimmermann y Taussig, 1996), S-nitrosilación mediada por el óxido nítrico (Hill *et al.*, 2000) y glicosilación (Wu *et al.*, 2001), que alteran la actividad de la enzima.

Se ha propuesto que la estructura general de las ACs (Figura 6) consiste en una región amino terminal corta, seguida por 6 segmentos transmembranales (M1), un dominio citoplasmático largo (C1), una segunda región de 6 segmentos transmembranales (M2) y otro dominio citoplasmático largo que alcanza el extremo carboxilo (C2) (Hurley, 1999; Cooper., 2003). En los mamíferos, el sitio catalítico de la AC es la región más conservada y está constituido por los dominios C1a y C2a (Tesmer *et al.*, 1997). Se ha sugerido que los dominios M1 y M2 dirigen a la enzima hacia la membrana plasmática y proveen la estructura para que otras proteínas de señalización se ensamblen cerca de la AC (Tesmer y Sprang, 1998).

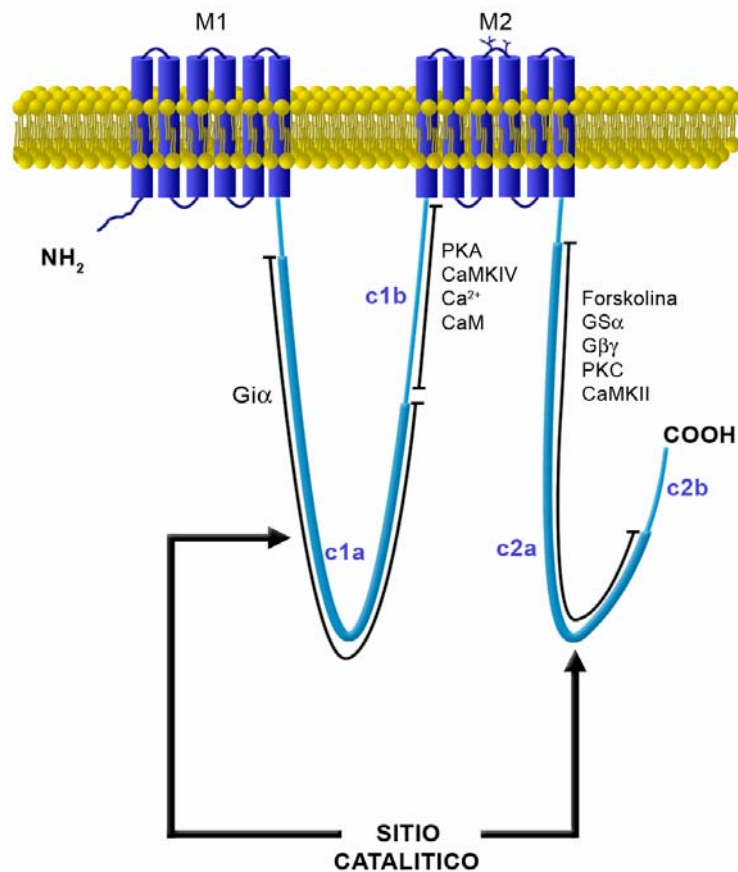


Figura 6: Composición molecular de la adenilato ciclasa en mamíferos. Se muestra la estructura de la AC y se identifica la ubicación de algunos reguladores de la actividad de la AC (Hanoune *et al.*, 1997).

Durante la última década se han logrado identificar algunos de los sitios reguladores de esta enzima (Figura 6). El dominio C1a es el principal sitio de unión de la subunidad α de la proteínas G_i , mientras que el C2a es sensible a la subunidad $G_{s\alpha}$, la subunidad $\beta\gamma$ y al diterpeno forskolina. Asimismo, el dominio C2a contiene sitios susceptibles de ser fosforilados por la cinasa C de proteínas (PKC) y de la cinasa dependiente de calcio calmodulina II (CaMKII). Finalmente, en el dominio C1b se localizan sitios de reconocimiento para el complejo calcio-calmodulina, el calcio libre, CaMKIV y la cinasa dependiente del AMPc (PKA) (Tesmer y Sprang, 1998). En mamíferos se ha identificado una AC soluble (AC10) que es filogenéticamente distinta de las ACs membranales, y se considera más cercana a las ACs de las *cianobacterias* (Jaiswal y Conti, 2001). Recientemente, se ha logrado cristalizar a la AC soluble de la cianobacteria *Spirulina platensis* ya sea unida al ATP, al calcio o al bicarbonato, lo cual representa diferentes estadios catalíticos de la enzima (Steebhorn *et al.*, 2005; Tesmer 2005).

9.2 Múltiples isoformas de la adenilato ciclasa

En mamíferos se han identificado los 9 genes distintos que codifican a las diferentes isoformas de la AC adosadas a la membrana plasmática (Patel *et al.*, 2001), y el gen que codifica para la isoforma soluble (Buck *et al.*, 1999). Las isoformas de la AC se han dividido en 5 familias distintas basadas en la similitud de su secuencia y sus mecanismos de regulación (Tabla 1). Las formas sensibles al complejo calcio-calmodulina son las tipo 1, 3 y 8, por lo que se refieren como AC1, AC3 y AC8. Las formas que son reguladas por las proteínas G incluyen a las isoformas AC2, AC4 y AC7. Por otro lado, los tipos AC5 y AC6 son inhibidas por concentraciones submicromolares de calcio libre intracelular y por las subunidades α_i de las proteínas G. La AC9 es altamente insensible a la activación por el diterpeno forskolina (activador de amplio espectro de las ACs) y es inhibida por la desfosforilación mediada por la calcineurina. Finalmente, la AC10 una isoforma soluble que se localiza en los espermatozoides y que es similar a las adenilato ciclasas de las *cianobacterias* (Cooper 2003).

Isoforma ^{a,b}	Distribución	Posible función	Regulación	
			Estimulación	Inhibición
AC 1	Cerebro, médula espinal y retina	Ciclo circadiano, memoria y aprendizaje	Gs α , Ca ²⁺ -CaM	Gi α^c , G $\beta\gamma$, CaMKIV
AC 2	Cerebro	Plasticidad sináptica	Gs α , G $\beta\gamma^e$, PKC	
AC 3	Cerebro, corazón, epitelio olfatorio, pulmón, células germinales	Olfacción y fertilidad	Gs α , Ca ²⁺ -CaM ^d	CaMKII
AC 4	Cerebro, corazón, riñón, hígado	Señales de transducción	Gs α , G $\beta\gamma^e$	
AC 5	Cerebro, riñón, corazón y pulmón	Oscilaciones del tejido cardiaco, reabsorción de calcio en el riñón	Gs α , PKC	Ca ²⁺ , Gi α , PKA
AC 6	Ubicua	Oscilaciones del tejido cardiaco, reabsorción de calcio en el riñón	Gs α	Ca ²⁺ , Gi α , PKA, PKC
AC 7	Ubicua	Dependencia al etanol	Gs α , G $\beta\gamma^e$	
AC 8	Cerebro	Memoria y aprendizaje	Gs α	
AC 9	Cerebro, corteza adrenal, gónadas, páncreas	Memoria y aprendizaje	Gs α	Calcineurina
AC 10	Testículo	Capacitación espermática	HCO ₃	¿?

FSK, forskolina; Ca²⁺-CaM, complejo calcio-calmodulina

^a Todas las isoformas, excepto la AC10 son inhibidas por análogos del sitio P

^b La forskolina estimula a las AC1-AC8, mientras que la AC9 es débilmente estimulada por forskolina y la AC10 no es afectada por la forskolina

^c Gi α inhibe a la AC1 estimulada por el complejo calcio-calmodulina

^d La AC3 es estimulada *in vitro* por el complejo calcio-calmodulina en presencia del Gpp (NH)p o forskolina. En células intactas el complejo calcio-calmodulina inhibe la actividad de la AC3 (ver texto).

^e La estimulación por G $\beta\gamma$ de las isoformas de la AC están condicionadas a una coactivación por la subunidad Gs α .

9.3 Mecanismos de regulación de las adenilato ciclasas

Las ACs son reguladas por una amplia variedad de mecanismos que incluyen a las proteínas G, incrementos en la concentración intracelular del calcio libre y la fosforilación. Cada isoforma de la AC presenta propiedades de regulación únicas, lo cual se refleja en la complejidad de la vía de señalización del AMPc.

Regulación por proteínas G

La actividad de algunas de las ACs es regulada por las proteínas G. El mecanismo general consiste en que una hormona o neurotransmisor (dopamina, noradrenalina, glucagon o adenosina, entre otras) se une a su receptor localizado en la membrana plasmática, el cual a su vez está acoplado a una proteína G. La activación de este receptor favorece la disociación de la proteína G, liberando a la subunidad α y al dímero $\beta\gamma$. Existen numerosas familias de subunidades α que pueden tanto estimular ($G\alpha_s$), como inhibir ($G\alpha_i$) la actividad de las ACs. Todas las isoformas de la AC membranales son estimuladas por las $G\alpha_s$, en tanto que las $G\alpha_i$ tienen una regulación selectiva, inhibiendo a la isoformas AC5 y AC6 por medio de las 3 subunidades de la $G\alpha_i$, mientras que la AC1 es inhibida por la $G\alpha_0$ (Taussig *et al.*, 1994). Existen diversas variantes de las subunidades $\beta\gamma$ que son potentes estimuladores de los tipos AC2, AC4 y AC7, mientras que sobre las isoformas AC1 y AC8 presenta un efecto inhibitor (Olianas *et al.*, 1998).

Regulación por calcio

Todas las isoformas de la AC son inhibidas por concentraciones elevadas de calcio, es decir, en condiciones no fisiológicas donde se alcanzan niveles de rango submilimolar (Cooper, 1991). Las variaciones en la concentración intracelular de calcio producen una gran variedad de respuestas en las diferentes isoformas de la AC. Las isoformas AC5 y AC6 son inhibidas de forma directa en presencia del calcio intracelular en concentraciones submicromolares (aproximadamente 0.3 μM) y se cree que la entrada capacitiva de calcio es una fuente fisiológica del calcio que inhibe a estas isoformas (Cooper, 2003).

A diferencia de las ciclasas inhibidas por calcio, las isoformas AC1, AC3 y AC8, son moduladas por calcio intracelular en concentraciones submicromolares, pero es indispensable la presencia de la calmodulina (Cooper, 2003). Aunque la AC3 posee un alto grado de similitud con la AC1 y la AC8, su activación es notablemente distinta. La AC3 solamente es estimulada por el complejo calcio-calmodulina cuando también es activada fisiológicamente por las proteínas Gs o farmacológicamente por la forskolina. La afinidad por el calcio de las isoformas AC1 y AC3, difiere significativamente, ya que mientras la AC1 y la AC8 son estimuladas con concentraciones de calcio intracelular cercanas a las encontradas en una célula en reposo, la AC3 requiere de una concentración muy elevada de calcio (El valor de la EC_{50} del calcio libre para la AC3 es de $5.0 \mu\text{M}$) (Choi *et al.*, 1992). Por otro lado, las isoformas AC1 y AC8 pueden ser estimulados por el complejo calcio calmodulina en presencia o en ausencia de proteínas Gs y forskolina con valores aproximados de EC_{50} de $0.1 \mu\text{M}$ y $0.5 \mu\text{M}$, respectivamente (Wang y Storm, 2003).

Regulación por fosforilación

La modulación de la actividad enzimática por fosforilación es una característica común en la regulación de las cascadas de señalización. En este contexto, la fosforilación de las AC5 y AC6 por la cinasa dependiente del AMPc (PKA) provee un asa de retroalimentación negativa, puesto que disminuye la síntesis del AMPc (Iwami *et al.*, 1995). La fosforilación mediada por la cinasa C de proteínas (PKC) frecuentemente resulta de la activación de un receptor de membrana acoplado a una proteína G_q , la cual activa a la fosfolipasa C (PLC). La PLC activada cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato produciendo inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 induce la liberación de calcio de los almacenes intracelulares al unirse al receptor de IP_3 . Finalmente, el calcio induce la traslocación de la PKC a la membrana, en donde es activada por el DAG. Al activarse la PKC se altera la producción del AMPc, de tal manera que las isoformas AC1, AC2, AC3, AC5 y AC7 son estimuladas, mientras que las isoformas AC4 y AC6 son inhibidas en respuesta a esta fosforilación (Zimmermann y Taussig, 1996).

Aunque el complejo calcio-calmodulina es capaz de activar las isoformas AC1 y AC8 de manera directa, también es capaz de inhibir indirectamente a la AC1 mediante la fosforilación mediada por la cinasa dependiente de calcio calmodulina tipo IV (CaMKIV) (Wayman *et al.*, 1996). De igual forma, la AC3 que es una isoforma estimulada por la presencia concomitante del complejo calcio-calmodulina y la proteína Gs, también es inhibida de forma indirecta por medio de la fosforilación por la cinasa CaMKII (Wayman *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1996). Este efecto dual del calcio sobre la actividad de una misma isoforma refleja la presencia de un asa de retroalimentación negativa generada por un mismo estímulo (Wei *et al.*, 1996).

Otros mecanismos de regulación

La hidrólisis del ATP mediada por la AC genera como productos AMPc y pirofosfato. Las concentraciones elevadas de pirofosfato favorecen una conformación de la AC que previene la unión de ATP al sitio catalítico de la enzima (Dessauer y Gilman, 1997). El agente antiviral foscarnet, o el ácido fosfonofórmico mimetizan la acción inhibitoria del pirofosfato sobre la actividad de la AC (Kudlacek *et al.*, 2001). Todas las ACs son inhibidas directamente por ciertos derivados de la adenosina que actúan específicamente en el sitio P y son potenciados por la presencia de pirofosfato (De'saubry *et al.*, 1996). Estos derivados inhiben la actividad de la AC, aparentemente, mediante un mecanismo no competitivo (Tesmer *et al.*, 2000). Uno de los compuestos sintéticos más eficaces es la 2',5'-dideoxiadenosina-3'-trifosfato (2',5'-dd-3'-ATP), puesto que presenta una IC₅₀ en el rango submicromolar (De'saubry *et al.*, 1996; Tesmer *et al.*, 2000).

La AC9 ha sido poco estudiada y su mecanismo de regulación aún no ha sido totalmente descrito, se conoce que esta isoforma presenta una baja sensibilidad a la forskolina. Al igual que el resto de las isoformas adosadas a la membrana plasmática, es estimulada por la proteína Gs (Premont *et al.*, 1996). Se ha descrito que la AC9 es inhibida por la fosfatasa calcineurina que es dependiente del complejo calcio-calmodulina, pero se desconoce cuál cinasa fosforila a esta isoforma (Antoni *et al.*, 1998).

La adenilato ciclasa soluble (AC10) ha sido la última isoforma de mamíferos en ser descrita. Su actividad enzimática diverge de las isoformas membranales ya que es insensible a la presencia de las proteínas G y al fármaco forskolina, en cambio el bicarbonato y el calcio son potentes estimuladores de la actividad de la AC10 (Cooper, 2003; Litvin *et al.*, 2003). De hecho, el rango de concentración de bicarbonato requerido para la activación de esta isoforma es similar al encontrado en el fluido del epidídimo ($EC_{50} \approx 20$ a 50 mM) en el cual la AC10 se encuentra expresada abundantemente (Chen *et al.*, 2000). Se ha propuesto que la AC10 es un sensor metabólico, similar al observado en las ACs descritas en *cianobacterias* (Zippin *et al.*, 2001).

9.4 Distribución de las adenilato ciclasas y su función

Si bien la familia de AC se encuentra presente en todo el organismo, el cerebro es el único órgano que expresa a todas sus isoformas. Las variantes más abundantes en el sistema nervioso central son: AC1, AC2 y AC3. Algunas de las isozimas se expresan de forma dominante en áreas específicas (La AC3 en neuronas olfatorias y la AC5 en los ganglios basales), mientras que otras están ampliamente distribuidas en el cerebro (AC2, AC6 y AC7) (Chern 2000). El patrón de expresión es un indicador importante que sugiere el posible mecanismo de regulación fisiológica (Hanoune y Defer, 2001).

Sistema nervioso central

Hasta el momento, la AC1 es la única isoforma que se ha encontrado localizada de forma exclusiva en el cerebro y se ha asociado su presencia en la glándula pineal con la biosíntesis de la melatonina, la hormona que modula el ciclo circadiano (Chang y Reppert, 2001). Además, se ha detectado un alto grado de expresión del ARN mensajero (ARNm) de los tipos AC1, AC2, AC4 y AC8 en el hipocampo (giro dentado, área CA1-CA3) y la corteza cerebral (Villacres *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 1999). Estas regiones participan en la plasticidad sináptica que es necesaria para el establecimiento de la potenciación a largo plazo (long-term potentiation ó LTP), lo que sugiere un papel en los procesos del aprendizaje y la memoria. Se ha propuesto que la expresión y la actividad de la AC pueden ser reguladas de diferente manera por la adquisición de distintos tipos de aprendizaje (Guillou *et al.*, 1999).

Aplicando diferentes tareas de aprendizaje (tareas de memoria espacial *versus* tareas de memoria de procedimiento) las AC sensibles e insensibles a calcio estimulan de forma diferente la actividad neuronal en el hipocampo. Por esta razón, se ha postulado la hipótesis de que cada subtipo de la AC puede jugar un papel específico en ciertos procesos de memoria y aprendizaje, dependiendo de la región del cerebro (Guillou *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 1999). La localización de la AC9 es ubicua en el cerebro, incluyendo hipocampo (giro dentado, en los campos CA1 y CA3), en el hipotálamo (núcleo supraóptico) y también se localiza en diversos tejidos endocrinos, tales como la corteza adrenal, el páncreas, los ovarios y los testículos (Premont *et al.*, 1996). Se ha postulado que una de sus posibles funciones es la de participar en la memoria y el aprendizaje. Esto se debe a que la AC9 se encuentra presente en las mismas subregiones del hipocampo en las que se encuentran las isoformas AC1 y AC8 (Antoni *et al.*, 1998).

La AC3 fue identificada en el epitelio olfatorio (Bakalyar y Reed, 1990) y, posteriormente, se detectó en numerosos tejidos incluyendo el corazón, el músculo liso vascular, las células germinales, el cerebro y el pulmón (Ishikawa *et al.*, 2000). Hasta el momento, se ha logrado conocer mejor el papel que tiene esta isoforma en la detección de odorantes. Aunque el epitelio olfatorio principal expresa varias isoformas, incluyendo a las AC2, AC3 y AC4, se han encontrado evidencias que muestran que la AC3 juega un papel fundamental en la olfacción (Wong *et al.*, 2000). Se ha propuesto que el AMPc es un importante modulador en la percepción de los odorantes, puesto que la señal de este segundo mensajero desaparece con rapidez permitiendo detectar un segundo estímulo del odorante, con lo cual se logra discriminar si la fuente de un odorante en particular se está acercando o alejando (Wang y Storm, 2003).

Maduración de espermatozoides

En el proceso de la espermatogénesis, se ha reportado que eventos asociados a la maduración y a la motilidad de los espermatozoides, así como a la reacción acrosomal son mediadas por AMPc. Este segundo mensajero juega un papel crítico en la expresión de genes involucrados en la diferenciación de las células germinales haploides (Neer 1978).

Se han detectado a la isoforma AC3 (Gautier-Courteille *et al.*, 1998) y a la AC soluble AC10 (Buck *et al.*, 1999) en los espermatozoides. La primera se localiza en las membranas acrosomales de las espermátides maduras durante la espermatogénesis (Gautier-Courteille *et al.*, 1998), lo cual sugiere que esta ciclasa participa en la biogénesis del acrosoma y en la producción de los gametos y la fertilización. La expresión del ARNm de esta isoforma soluble se incrementa durante la espermatogénesis, lo que sugiere que la proteína continúa presente en el espermatozoide maduro y que puede tener funciones específicas en la fertilidad (Sinclair *et al.*, 2000).

Función cardiaca y renal

La isoformas AC5 y AC6 presentes en corazón han sido clonadas y caracterizadas, y al parecer contribuyen en las oscilaciones y/o en el mecanismo oscilador del tejido cardiaco (Cooper *et al.*, 1995). Asimismo, se les ha asociado al mantenimiento de la permeabilidad de las células endoteliales (Stevens *et al.*, 1995). En el riñón, se ha encontrado que la AC6 se distribuye a lo largo de toda la nefrona, mientras que la AC5 está restringida al glomérulo y a las porciones cortical y medular externa del tubo colector (Chabardes *et al.*, 1996). Adicionalmente, se ha postulado que la vía del AMPc participa en la reabsorción de calcio mediado por el receptor RaKCaR (receptor que detecta calcio extracelular en el riñón de la rata) (Chabardes *et al.*, 1999).

Planteamiento del problema

Si bien se ha estudiado con detalle la fase inicial de acción del GABA como un facilitador de la secreción de la GnRH, poco se conoce sobre los mecanismos del efecto persistente del GABA que produce una inhibición prolongada de la liberación de este neuropéptido en las células GT1. El objetivo general de este proyecto es el estudiar los mecanismos que participan en esta fase tardía de inhibición. Hasta el momento se había descrito que esta fase de inhibición se caracteriza por una disminución en la secreción de la GnRH y el decremento en la $[Ca^{2+}]_i$, hasta alcanzar niveles menores a los iniciales (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1997).

Existen diversas vías de señalización que podrían modular la secreción de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1995), y nosotros elegimos estudiar a la vía del AMPc, puesto que este segundo mensajero ha sido ampliamente caracterizado, y además se ha demostrado que influye sobre la secreción de la GnRH (Paruthiyil *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar de la importancia de la vía de señalización de AMPc como un modulador central en la secreción de la GnRH, poco se conoce sobre la familia de las AC expresadas en las neuronas GnRHérgicas, y sobre la modulación de su actividad en respuesta al efecto persistente del GABA en estas células.

En nuestro laboratorio se demostró que existe una correlación inversa entre el GABA y el AMPc en la línea celular GT1. De acuerdo a lo anterior, el GABA produce una caída dosis-dependiente de la concentración intracelular del AMPc que perdura por lo menos 30 minutos (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que el GABA podría inhibir la secreción de la GnRH mediante la disminución de la concentración intracelular del AMPc (Yoshida *et al.*, 2003). Esta caída puede ser explicada por un aumento en la actividad de degradación del AMPc por la familia de las fosfodiesterasas y/o por una disminución en la síntesis del AMPc mediada por la familia de las ACs. Dado que en los experimentos anteriores (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001) se utilizó a un inhibidor de amplio espectro de las fosfodiesterasas, es sugerente que la caída en la $[AMPc]_i$ se deba a una baja en la actividad de las ACs (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001).

La explicación más intuitiva sobre el mecanismo de acción del GABA supondría la participación del receptor GABA_B, debido a que es un receptor metabotrópico acoplado a las proteínas G y que puede modular negativamente a las ACs (Billinton *et al.*, 2001). Sin embargo, el uso del baclofen (agonista del receptor metabotrópico GABA_B) no mimetizó el efecto del GABA. Contrario a lo esperado, el muscimol (agonista del receptor ionotrópico GABA_A) produce la disminución dosis-dependiente de la [AMPC]_i. Más aún, la administración del GABA de forma concomitante con dosis crecientes de bicuculina (antagonista del receptor GABA_A), restableció la [AMPC]_i (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001)

Los resultados descritos previamente apoyan la propuesta de que la caída sostenida en la síntesis del AMPc es mediada por el receptor ionotrópico GABA_A cuya estimulación genera la despolarización de la membrana y, en consecuencia, un influjo de calcio a través de canales tipo L (Spergel *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1997). Este aumento en el calcio intracelular podría inhibir al menos 4 isoformas de la familia de las ACs (AC tipo 3, 5, 6 y 9). Por lo tanto, proponemos cómo hipótesis de trabajo que el aumento en calcio intracelular inducido por GABA y mediado por su receptor GABA_A tiene como consecuencia una disminución en la actividad global de AC abatiendo la síntesis de AMPc.

Hipótesis

La activación de los receptores GABA_A induce una entrada de calcio por los canales de calcio tipo L que disminuye de forma sostenida la actividad de las adenilato ciclasas y, en consecuencia, reduce la síntesis del AMPc. Este mecanismo podría explicar la inhibición prolongada de la secreción de la GnRH mediada por la acción persistente del GABA.

Objetivos

- 1.- Determinar la proporción relativa de las 9 isoformas conocidas de las adenilato ciclasas en las células GT1-7.
- 2.- Caracterizar el efecto del calcio sobre la actividad global de la adenilato ciclasa en las células GT1.
- 3.- Analizar la dependencia del calcio en el efecto del GABA al inducir la caída en AMPc
- 4.- Identificar el mecanismo de acción del calcio y las isoformas más abundantes a nivel de ARNm de las adenilato ciclasas sensibles al calcio expresadas en las células GT1.
 - a) AC3 mediante ser fosforilada por la CamKII
 - b) AC9 mediante ser desfosforilada por la calcineurina
- 5.- Evaluar el papel del GABA como un potencial modulador de la expresión de las ACs.

Metodología

1. Cultivo celular

Las células GT1 se cultivaron en cajas de Petri de 100 mm de diámetro (Costar Corporation, Cambridge, MA), en medio de mantenimiento que consiste 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 CO₂. Para realizar la medición del AMPc intracelular se cultivan las células en placas de 24 pozos con una densidad de 150,000 células/mL utilizando el medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina.

2. Extracción de ARN

El ARN total se aisló de acuerdo al método previamente descrito por Chomczynsky y Sacchi (1987). Brevemente, la muestra se desnaturalizó con 4 M tiocianato de guanidina, sarcosinato lauril de sodio al 0.5% de peso/volumen con SDS, 0.1 M de β-mercaptoetanol y 25 mM de citrato de sodio a un pH de 4.2. El sobrenadante fue mezclado con 1 volumen de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (49:1 en 2/10 de volumen, respectivamente). La mezcla se mantuvo a 4 °C por 15 minutos. Después de centrifugar a 10,000 g por 15 minutos a 4 °C, la fase acuosa se recuperó y se mezcló con un volumen igual de isopropanol. La mezcla se mantuvo a -20 °C por una hora y se centrifugó a 10,000 g por 15 minutos a 4 °C y al finalizar se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con la mitad del volumen de tiocianato de guanidina, la mitad de volumen de isopropanol y 0.1M de 2-mercaptoetanol y se incubó a -20 °C por 1 hora. Se centrifugó a 10,000 g por 15 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con alcohol etílico al 70%. Por ultimo se decantó y resuspendió con agua libre de ARNasas y se le adicionó un de ARNasas. Posteriormente, el ARN total fue tratado con DNasa I (Ambion) para evitar la presencia de ADN genómico. El ARN total fue almacenado a -20 °C.

3. Retrotranscripción y la PCR

Se utilizaron 5 µg de ARN y se le añadió buffer de retrotranscripción, nucleótidos oligo dT (Biolabs), una mezcla de desoxinucleótidos (4 mM) y 1U de la enzima transcriptasa reversa de *Malone mammalian leucemia virus* (TRMMLV, Promega). La reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C y a continuación a 95 °C durante 5 minutos. El ADN complementario (ADNc) se amplificó mediante la técnica de la PCR utilizando la siguiente mezcla de reacción: mezcla de desoxinucleotidos (4 mM), buffer de reacción, MgCl (1.5 mM), ADNc, la mezcla de oligonucleótidos específicos (4 mM) y la enzima Taq polimerasa (1 U). En la siguiente tabla se muestra cada isoforma de la adenilato ciclase con su correspondiente secuencia de oligonucleótidos y el tamaño esperado del producto de amplificación, así como la referencia del banco genómico.

Isoforma	Referencia del banco genómico	Tamaño del producto	Secuencia del oligonucleótido
AC1	gi 20853568	160 pb	GGC CGA TCT GAA CTT CTT TAC
			CAC ACT CTG TGG GAT TAC CAG
AC2	gi 23956293	225 pb	AAG ATT AGC ACC ACG GAT GTG
			TGC AGT GGC TCG ATA TTC TTT
AC3	gi 24475810	480 pb	ACT CGG TGG AGA AGGAGA AG
			TAC AGG TTG AGG GCA GTC AC
AC4	gi 17978249	323 pb	TGA TGA ACT GGA CAC TGG TGA
			ACA CAC TTC GTC AGG TGC TCT
AC5	gi 17063797	187 pb	AGG TAG TGG GCC TGT TGC T
			CTG AAA CTG GTC TGG GAG TTG
AC6	gi 6671512	215 pb	GTT CCC ATA CTC CAC CCT GAT
			ACA CAA GCAGAACCG AGAAGA
AC7	gi 602411	195 pb	GGC TTA TGT TTG AAA CGG ACA
			GCC CCA TTC CTT AGA ACT CTG
AC8	gi 1814374	500 pb	ACT TGG TCT GTG CAT TTA TCG
			AAA GAG ACC TGC GTA GAT GGT
AC9	gi 6752979	219 pb	AAA CTG ATG CCC ACT TTG TTG
			TGG TTG ACA GAA ACA CAT CCA

La reacción se llevo a cabo bajo las siguientes condiciones: se desnaturalizó la muestra a 94 °C por 150 segundos, se realizaron 30 ciclos con los siguientes parámetros: incubación por 30 segundos a 94 °C, seguido de 30 segundos a la temperatura de hibridación a 62 °C y por último, 30 segundos de polimerización 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. 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.

4. Clonación de fragmentos genómicos.

Mediante la técnica de la PCR se obtuvieron fragmentos genómicos de las isoformas de interés. Cada fragmento se ligó en el vector pDrive (Qiagen) utilizado y se transformaron las bacterias competentes mediante un choque térmico. Una vez obtenidas las colonias se verificó la presencia del fragmento mediante la técnica de la PCR. Cada colonia identificada fue lisada y se extrajo el plásmido. El cual fue utilizado para realizar las curvas de calibración para la técnica de la PCR cuantitativa y para secuenciar el producto amplificado.

5. PCR en tiempo real

Para cuantificar la expresión de las isoformas de la adenilato ciclasa se utilizó el equipo de la 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)*. La reacción se llevo a cabo bajo las siguientes condiciones: una incubación de 60 segundos a 95°C. Posteriormente, se programaron 40 ciclos que consistieron en: 1) 1 segundos de desnaturalización a 94°C, 2) 10 segundos de hibridación utilizando la temperatura recomendable para cada par de oligonucleótidos y 3) 10 segundos de extensión a 72 °C. Al terminar cada ciclo el equipo realizó una medición única del fluoroforo *SYBR Green® I*. Finalmente se realizó una curva de disociación al medir de forma continua la fluorescencia generada por una rampa de temperatura de 55 a 95 °C que cambiaba con una razón de 0.1 °C/segundo.

6. Estudios de AMPc

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos tal como se describió previamente. A las 24 horas de cultivo se aspiró el medio y se preincubaron las células con un medio de mantenimiento adicionado con IBMX 1 mM durante una hora. Posteriormente, las células fueron tratadas con GABA, Verapamil, BayK 8644, y la combinación de GABA con verapamil e incubadas a 37 °C por 20 minutos (En todos los tratamientos se utilizó la dosis 10 µM). En el caso del verapamil se preincubaban las células 5 minutos antes de iniciar el tratamiento con GABA. Por último, se lisaron las células y se almacenaron a -70 °C hasta el día del ensayo. La medición del AMPc intracelular se realizó siguiendo las instrucciones del estuche comercial de inmunoensayo enzimático de Amersham (RPN225).

7. Ensayo de la fosfatasa PP2B (calcineurina)

La actividad de PP2B tanto basal como inducida por el GABA fue medida utilizando un estuche comercial (Serine/threonine phosphatase assay system, Promega Biotech). Las células GT1 fueron cultivadas en cajas de Petri de 100 mm de diámetro hasta que alcanzaron un 90% de confluencia y fueron tratadas por 20 minutos con GABA en presencia o ausencia de calcineurina (10 µM). Así mismo, se adicionó GABA en presencia o ausencia de verapamil 10µM y EGTA 3M. Para detener la reacción las células se congelaron a -70°C hasta el día del ensayo.

8. Protocolo de transfección para el siRNA dirigido a la AC9

Las células GT1-7 se cultivaron en placas de 24 pozos con medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino sin antibióticos. Posteriormente se incubaron por 24 horas. Se añadió una mezcla de transfección que contenía: siRNA duplex (Santa Cruz Biotechnology), el reactivo de transferencia (Santa Cruz Biotechnology) y el medio OptiMEM (GIBCO) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el medio de mantenimiento y se adicionó la mezcla de transfección. Después de 6 horas en el incubador a 37°C se añadió un volumen igual de medio D-MEM con 20% de suero fetal bovino y 200 U/mL de penicilina-estreptomicina. Al día siguiente se aspiró la mezcla de transfección y se reemplazó por medio de mantenimiento. Las células se analizaron entre 48 y 72 horas después de añadir el reactivo de transfección.

9. Ensayo de medición de luciferasa

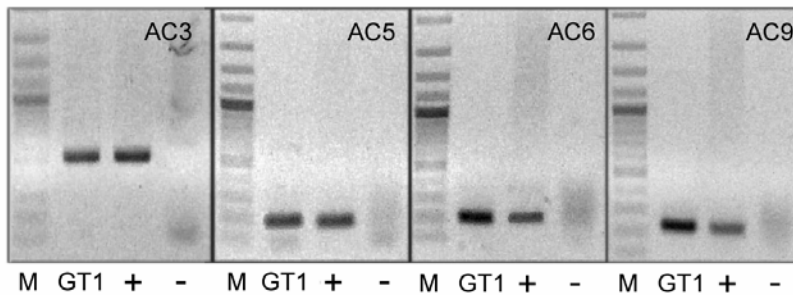
Se cultivaron las células GT1-7 igual que en el protocolo anterior de transfección del siRNA y al día siguiente se lavaron las células gentilmente con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Posteriormente, las células se lisaron con un reactivo de lisis pasiva (Promega Biotech) y se agitaron suavemente por 15 minutos a temperatura ambiente. El lisado se transfirió a un tubo. La señal generada por la luciferasa se midió en un luminómetro (TD 20/20 marca Turner designs).

Resultados

1. Caracterización de la expresión del ARNm de las isoformas de la adenilato ciclasa

Debido a que se carece de información respecto a que isoformas de la adenilato ciclasa (AC) están presentes en las células GT1-7 caracterizamos la expresión de las 9 isoformas de la AC a nivel de ARN mensajero (ARNm) por el método de la RT-PCR. Con este objetivo se cultivaron las células GT1-7 bajo las condiciones descritas en la metodología y posteriormente se obtuvo el ARN total que fue retrotranscrito a ADN complementario (ADNc). Al mismo tiempo, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada isoforma de la AC. Encontramos que en las células GT1-7 se expresan 8 de las 9 isoformas conocidas de AC; en nuestras manos no se detectó a la AC8. Cada fragmento de ADN fue clonado y se confirmó la identidad de cada variante de la AC por medio de la secuenciación de cada uno de los productos clonados (Figura 7).

Reguladas negativamente por calcio



Reguladas positivamente por calcio Insensibles al calcio

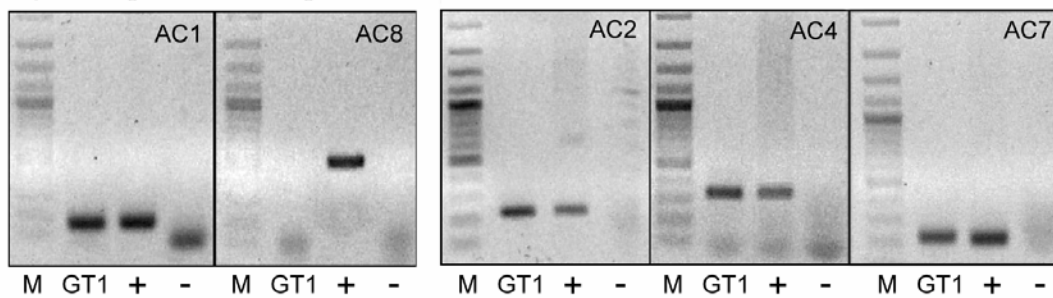


Figura 7: Las células GT1-7 expresan 8 isoformas de la adenilato ciclasa. Gel de agarosa representativo que documenta la amplificación de las 9 isoformas membranales de la adenilato ciclasa (AC); utilizando extractos de células GT1, cerebro de ratón como control positivo (+) y un control negativo sin RT (-). Las AC fueron clasificadas en función de su regulación por calcio. (M) Marcador de peso molecular de ADN.

Debido a que las células GT1-7 expresan el ARNm correspondiente a isoformas de AC tanto activadas como inhibidas por incrementos en la $[Ca^{2+}]$, decidimos evaluar si la proporción relativa de los miembros de estos grupos se inclinaba hacia las formas inhibibles, o por el contrario se inclinaba hacia las formas activables. Con el fin de resolver esta pregunta, analizamos la abundancia relativa de cada una de estas isoformas mediante el método de la PCR cuantitativa. Con la PCR en tiempo real corroboramos los datos cualitativos encontrados por la técnica de la RT-PCR convencional. En este sentido encontramos la expresión de 8 de las 9 isoformas de la AC. Por el método de la PCR en tiempo real analizamos la proporción relativa de las variantes de la AC (Figura 8) y encontramos la expresión de ACs que son inhibidas por calcio (AC tipo 3, 5, 6, y 9), abarcando un 31.2% del total de las ACs y un 98% del total de las isoformas moduladas por calcio.

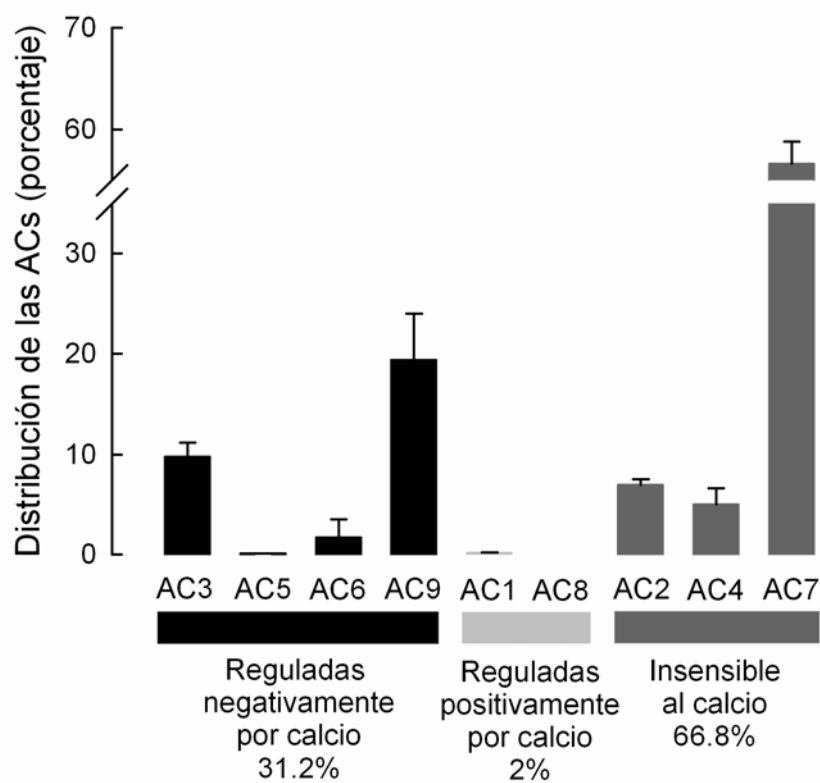


Figura 8: Distribución de las isoformas de la adenilato ciclasa expresadas en las células GT1-7. El ARN total fue extraído de las células GT1-7 y se utilizó para la transcripción reversa seguida de un análisis cuantitativo absoluto utilizando la PCR en tiempo real mediante la detección del SYBR green I. Las adenilato ciclasas se clasificaron en función de su regulación por calcio. Cada columna representa la media \pm E.E. de 5 experimentos independientes.

En relación a las ACs activadas por calcio identificamos una baja expresión de la AC1 correspondiente a un 2% del total de las ACs y no detectamos a la AC8. Por último, encontramos que un 66.8% de las ACs corresponden a las isoformas insensibles al calcio que son reguladas por proteínas G (AC2, AC4 y AC7).

2. El GABA disminuye la acumulación del AMPc en las células GT1-7 a través de un mecanismo dependiente de la entrada de calcio.

Dado que encontramos un predominio de AC que son inhibidas por calcio en las células GT1-7, nos preguntamos si esta proporción a nivel de la expresión del ARNm se conserva a nivel de actividad enzimática. Por lo tanto, esperaríamos encontrar que el calcio produzca un efecto global inhibitorio sobre la síntesis del AMPc. Para este objetivo determinamos la acumulación de la $[AMPc]_i$ en cultivos de células GT1-7 que fueron preincubados por 1 hora con IBMX (1 mM) para bloquear la degradación del AMPc por fosfodiesterasas. Como control del IBMX utilizamos células que recibieron únicamente el vehículo (EtOH al 0.1%). A continuación se trataron las células por 20 minutos con el Bay K 8644 (10 μ M) y el verapamil (10 μ M), que son el agonista y antagonista de los canales de calcio operados por voltaje tipo L (CCOVL), respectivamente.

Encontramos que al inducir la apertura del canal de calcio con Bay K 8644 se disminuyó la acumulación del AMPc intracelular de forma significativa alcanzando niveles similares a los registrados en el control sin IBMX (Figura 9). Asimismo, el bloqueo de los canales de calcio no afecta la síntesis del AMPc en comparación con el control de IBMX. Dado que encontramos que la entrada de calcio mimetiza el efecto del GABA al disminuir la síntesis del AMPc (Beltran-Parrazal *et al.*, 2001), exploramos el papel del calcio intracelular como un posible intermediario del GABA (10 μ M) para deprimir la actividad de las ACs. Para este objetivo se administró de forma concomitante al antagonista del canal de calcio tipo L, verapamil y al GABA (ambos en una dosis 10 μ M) y se encontró que al bloquear los canales de calcio tipo L se previno la caída en la síntesis del AMPc mediada por el GABA.

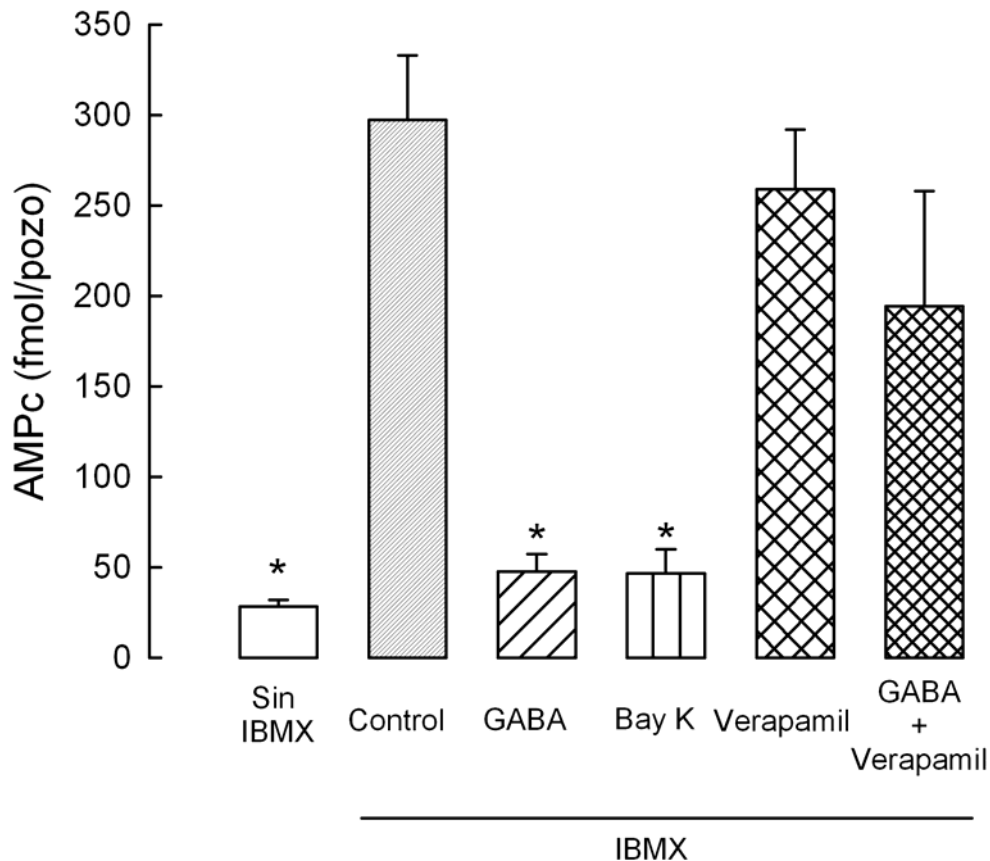


Figura 9: El GABA disminuye la acumulación del AMPc en las células GT1-7 a través de un mecanismo dependiente de canales de calcio. Las células GT1-7 fueron preincubadas o no (barra blanca) con IBMX 1mM (de amplio espectro de las fosfodiesterasas) por 1 hora antes de adicionar GABA, Bay K 8644 o verapamil (En todos los tratamientos se utilizó 10 μ M) por 20 minutos. Los niveles del AMPc fueron determinados por inmunoensayo enzimático. Cada columna representa la media \pm E.E. de 6 determinaciones independientes. * $p < 0.05$ vs control.

3. La disminución de AMPc por el GABA es bloqueada por inhibidores de la calcineurina y disminuida por la inhibición de la CamKII.

Nuestros resultados muestran que una entrada de calcio por canales CCOVL inhibe la actividad global de las ACs, sin embargo, desconocemos el mecanismo de acción de este catión y la identidad de la(s) isoforma(s) de la AC relacionadas a este efecto. El incremento en la concentración de calcio intracelular disparado por el GABA puede afectar la actividad de las isoformas sensibles al calcio de la AC, particularmente a la AC3 y a la AC9, que son las variantes de la AC más abundantes de este grupo en las células GT1-7.

Por lo tanto, nos propusimos evaluar: 1) el efecto de la calcineurina que es conocida también como la fosfatasa PP2B y que tiene como blanco a la AC9 produciendo la inhibición de la síntesis del AMPc (Antoni *et al.*, 1998) y 2) la cinasa dependiente de calcio calmodulina tipo II (CamKII) que inhibe la actividad de la AC3 (Wei *et al.*, 1996). Para evaluar el primer punto administramos a inhibidores de la calcineurina, tales como: FK-506, ciclosporina A, fenvalerato ó deltamethrin (En todos los tratamientos se utilizó 10 μ M) en presencia de GABA 10 μ M y encontramos que se regeneraron los niveles del AMPc en valores cercanos al control con IBMX (Figura 10).

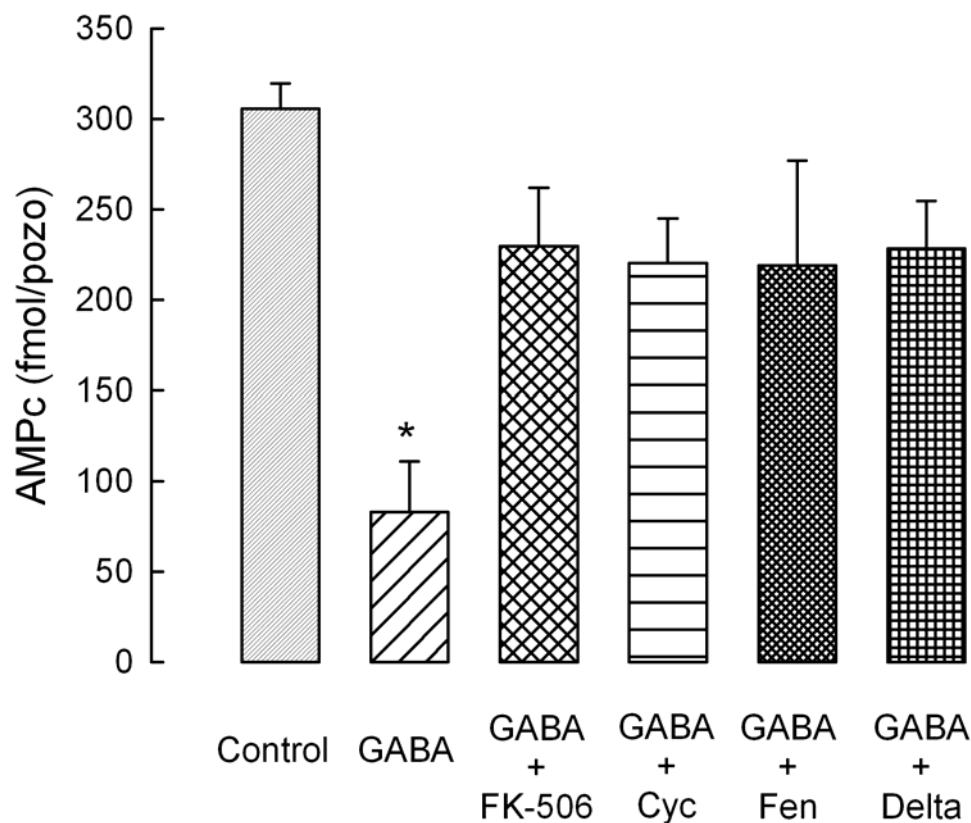


Figura 10: La inhibición en la acumulación del AMPc mediada por el GABA es bloqueada por los inhibidores de la calcineurina. Las células GT1-7 fueron preincubadas por 1 hora con IBMX 1mM antes de adicionar GABA en ausencia o presencia de los es de la calcineurina FK-506, ciclosporina A (Cyc), fenvalerato (Fen) or deltamethrin (Delta) (En todos los tratamientos se utilizó 10 μ M) por 20 minutos. Los niveles del AMPc fueron determinados por inmunoensayo enzimático. Cada columna representa la media \pm E.E. de 6 determinaciones independientes. * $p < 0.05$ vs control.

El bloqueo de la calcineurina con deltamethrin (Delta) es capaz de revertir los efectos tanto del GABA como del Bay K 8644 alcanzando niveles de acumulación del AMPc comparables al de las células tratadas únicamente con IBMX (Figura 11). Por otro lado, también exploramos el papel de la vía AC3/CamKII mediante bloquear la actividad de la CamKII y este tratamiento revirtió parcialmente la inhibición en la acumulación del AMPc inducida por GABA o Bay K 8644 (Figura 11).

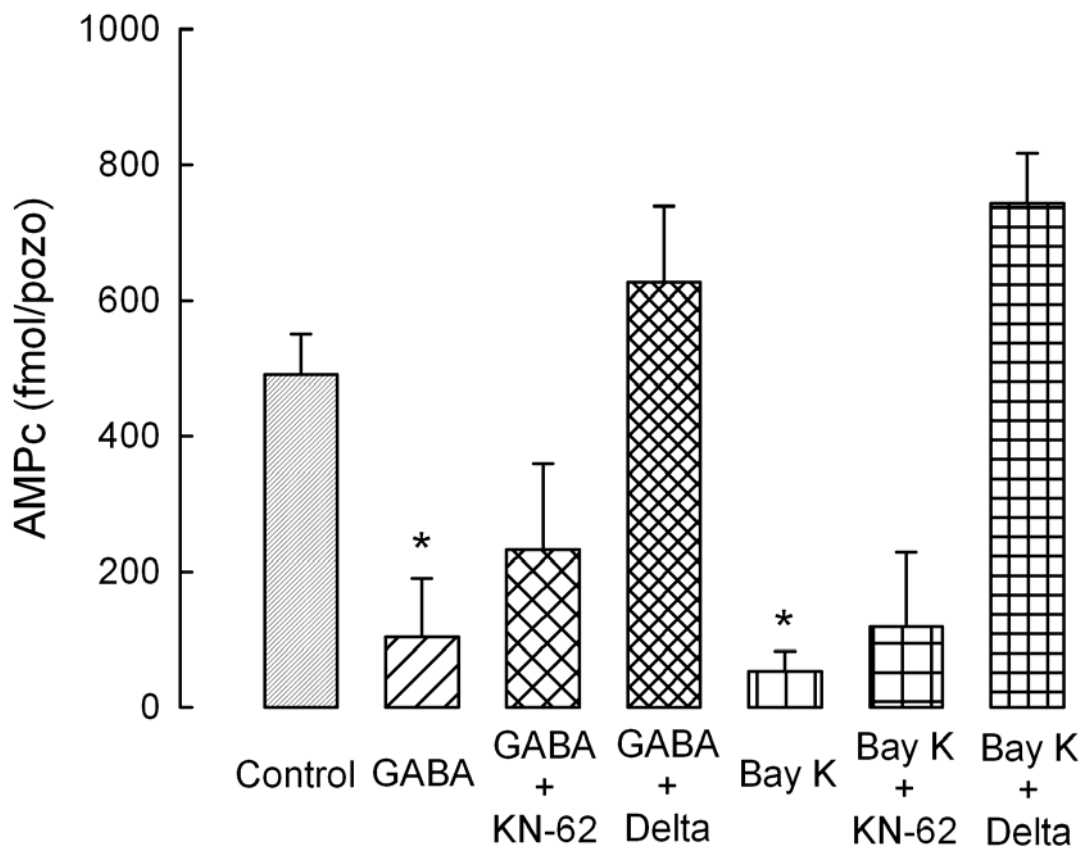


Figura 11: La disminución de la acumulación del AMPc inducida por el GABA o Bay K 8644 es revertida por completo por un de la calcineurina y parcialmente bloqueada por un de la CamKII. Las células GT1-7 fueron preincubadas por 1 hora con IBMX 1 mM antes de adicionarle el GABA y el Bay K 8644 únicamente o en combinación con el de la CamKII KN-62 o con el de la calcineurina deltamethrin (Delta) por 20 minutos (En todos los tratamientos se utilizó 10 μ M). Los niveles del AMPc fueron determinados por inmunoensayo enzimático. Cada columna representa la media \pm E.E. de 6 determinaciones independientes. * $p < 0.05$ vs control.

4. El GABA incrementa la actividad de fosfatasa a través de un mecanismo dependiente de la entrada de calcio.

Los resultados anteriores muestran por abordajes farmacológicos que el efecto del GABA sobre la caída en la acumulación del AMPc podría ser mediado por la calcineurina lo cual resultaría en la potencial inhibición de la actividad de la AC9. Esta fosfatasa es altamente dependiente del calcio para ser activada, en consecuencia nos interesó explorar el papel del GABA como activador de la calcineurina vía la activación de los canales de calcio tipo L. Para evaluar esta propuesta expusimos a las células GT1-7 con GABA 10 μ M por 20 minutos y encontramos un aumento significativo en la actividad de la fosfatasa (Figura 12 y 13). El efecto del GABA fue bloqueado por verapamil 10 μ M o EGTA 3 mM (Figura 12) atribuyendo la identidad de la fosfatasa a la calcineurina.

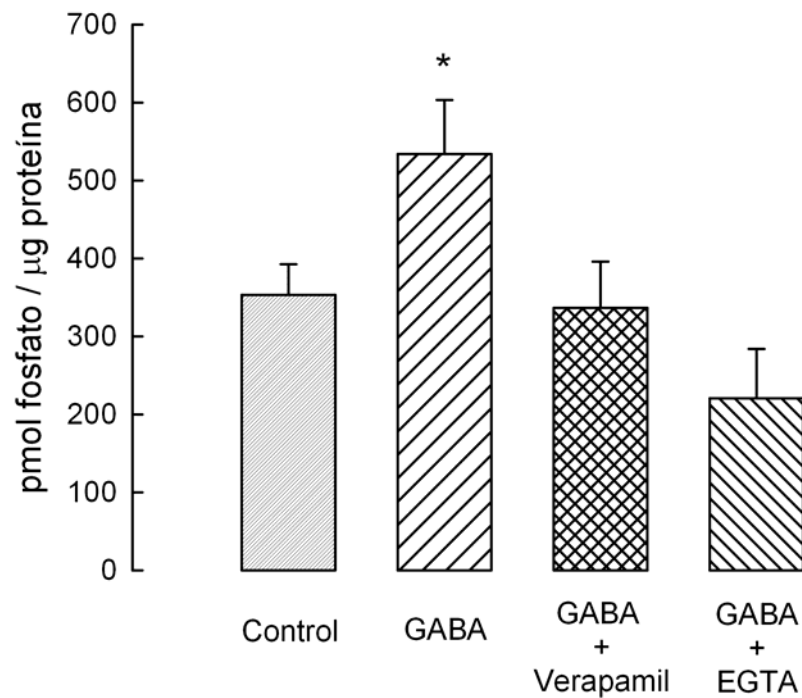


Figura 12: El GABA incrementa la actividad de fosfatasa a través de un mecanismo dependiente de canales de calcio. Las células GT1-7 fueron incubadas por 20 minutos con GABA (10 μ M) con o sin verapamil 10 μ M o EGTA 3 mM. La actividad de fosfatasa serina/treonina fue medida tal como se describe en la metodología. Cada columna representa la media \pm E.E. de 5 determinaciones independientes. * $p < 0.05$ vs control.

Más aún, en la figura 13 se muestra que el incremento en la actividad de la fosfatasa en respuesta al GABA también fue bloqueado por la co-incubación con los inhibidores de calcineurina: FK-506, ciclosporina A o fenvalerato (En todos los tratamientos se utilizó 10 μ M). Estos resultados confirman que el GABA, vía la activación de los receptores GABA_A, generó la apertura de los canales de calcio operados por voltaje y en consecuencia al aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ se incrementó la actividad de la calcineurina en las células GT1-7.

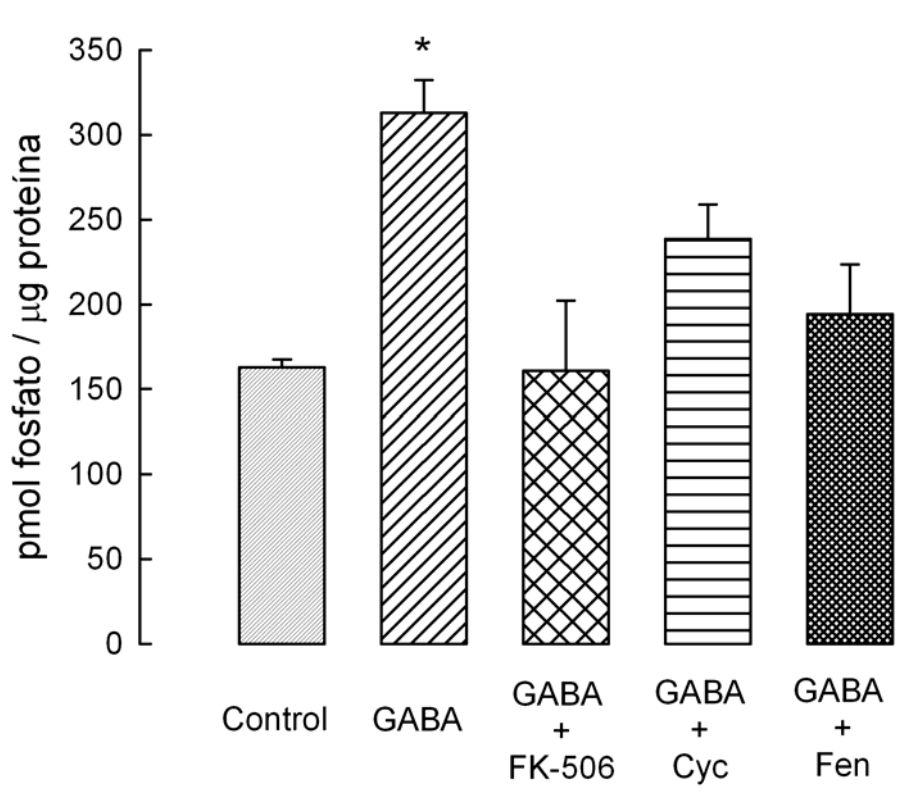


Figura 13: La actividad de fosfatasa inducida por el GABA es bloqueada por los es de calcineurina en las células GT1-7. Las células GT1-7 fueron incubadas con GABA 10 μ M y/o FK-506, ciclosporina A and fenvalerato por 20 minutos (En todos los tratamientos se utilizó 10 μ M). La actividad de fosfatasa serina/treonina fue medida tal como se describe en la metodología. Cada columna representa la media \pm E.E. de 3 determinaciones independientes. * $p < 0.05$ vs control.

5. El GABA incrementa la expresión del ARNm de la adenilato ciclasas tipo 7 y 9.

Aunque los receptores de GABA_A están clásicamente asociados con eventos iónicos transitorios (movilización de corrientes de cloro que inducen cambios en el potencial de membrana), existe evidencia reciente de que apoya el papel del GABA como regulador de la transcripción del ARN mensajero (Doepner *et al.*, 2005; Martyniuk *et al.*, 2005).

Dado que estamos interesados en evaluar el papel del GABA en la disminución de la acumulación del AMPc a largo plazo, nos preguntamos si el GABA sería capaz de inducir cambios a nivel genómico. Como un primer acercamiento, exploramos el efecto del GABA sobre las 2 isoformas más abundantes en las células GT1-7 (AC7 y AC9). Nuestros resultados muestran que la administración de GABA 10 μ M incrementa significativamente la expresión del ARNm de ambas isoformas (Figura 14). La curva temporal mostró que la AC7 un incremento gradual en la expresión que se duplicó a las 24 horas en relación con el control y se mantuvo hasta las 48 horas de incubación (Figura 14A). En contraste, la AC9 mostró una sensibilidad mayor al tratamiento con GABA al incrementarse en un 40% su expresión a las 6 horas de tratamiento y se sostuvo este aumento hasta las 48 horas de incubación (Figura 14B). A las 48 horas se comparó la intensidad de la respuesta entre las dosis de 10 μ M y 1 mM de GABA y los resultados mostraron que la AC7 tuvo una tendencia a aumentar sin ser significativa, mientras que la AC9 no mostró diferencia entre las dosis.

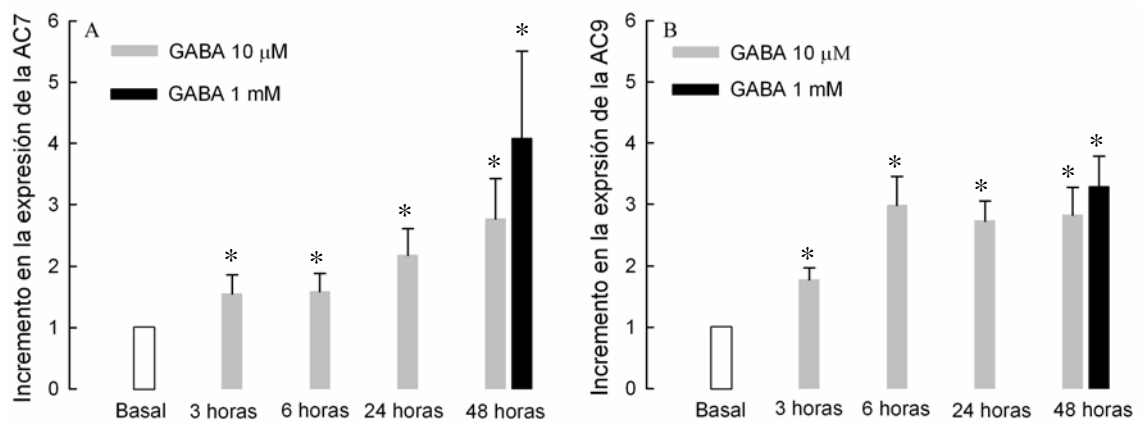


Figura 14: El efecto del GABA en la expresión del ARNm de la AC7 y la AC9. A) El GABA 10 μ M tiene una tendencia a aumentar expresión de la AC7 que alcanzar un incremento significativo a las 24 horas. En contraste, la AC9 alcanzó su pico máximo de expresión a las 6 horas y se mantuvo hasta las 48 horas de incubación B). La incubación a las 48 horas tanto con GABA 10 μ M como 1 mM produjeron el mismo incremento en la expresión. Cada columna representa la media \pm E.E. de 5 experimentos independientes.

6. Los receptores $GABA_A$ y $GABA_B$ están involucrados en la regulación de la expresión del ARNm mediada por el GABA.

Para investigar que tipo de receptor del GABA estaba involucrado en el incremento en la expresión de la AC7 y AC9, incubamos las células GT1-7 con muscimol ($10\mu\text{M}$, agonista de los receptores $GABA_A$) o baclofen ($10\mu\text{M}$, agonista de los receptores $GABA_B$) por 24 horas (Figura 15). Nuestros resultados mostraron que el muscimol y el baclofen incrementaron alrededor de 5 y 10 veces la expresión del ARNm de la AC7 y la AC9, respectivamente en comparación con los niveles basales de expresión del ARNm. Resultados preliminares mostraron que el baclofen tiene una tendencia a incrementar la expresión de la AC9 pero el error es muy grande debido a que son únicamente 2 experimentos independientes y se requiere de aumentar el número de determinaciones.

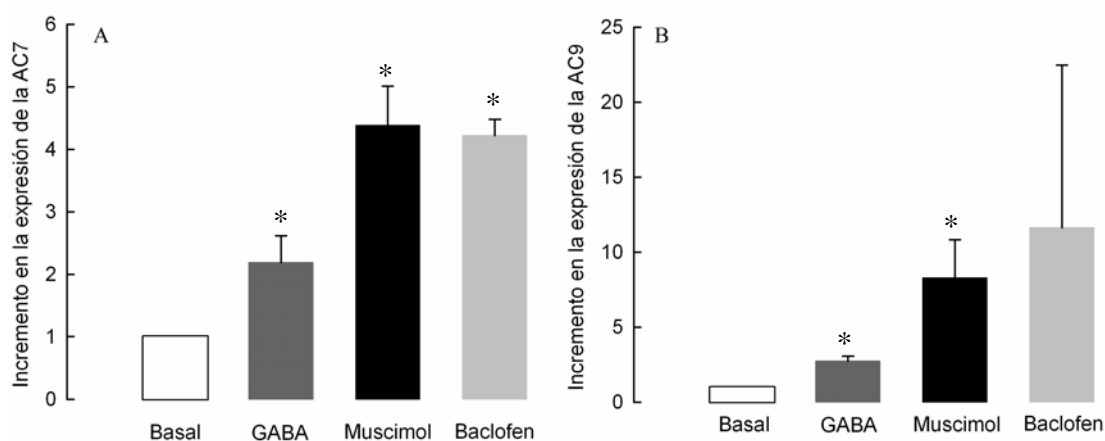


Figura 15: El efecto de agonistas de los receptores del GABA incrementan la expresión del ARNm de la AC7 y AC9. A) La incubación con muscimol y baclofen por 24 horas incrementó la expresión de la AC7 hasta 5 veces comparado con la expresión basal. Mientras que el muscimol aumento 10 veces la expresión de la AC9 en relación con la expresión basal B). Cada columna representa la media \pm E.E. de 3 experimentos independientes excepto el tratamiento con baclofen B) con 2 experimentos independientes.

7. Estandarización de la metodología para silenciar la expresión de la AC9

Dado que en este trabajo mostramos datos que sugieren fuertemente que la AC9 juega un papel crucial en la modulación GABAérgica de la formación del AMPc en las células GT1-7 nos interesa investigar si en ausencia o baja expresión de la AC9 sería capaz de prevenir o al menos disminuir marcadamente la inhibición sostenida de la síntesis del AMPc en respuesta una exposición persistente del GABA.

Por lo tanto, en esta sección nos proponemos discutir la estandarización de un método para silenciar la expresión de la AC9. Para este fin adquirimos comercialmente una mezcla de fragmentos pequeños de ARN de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés) para silenciar la expresión del ARNm de la AC9. Como un primer acercamiento cultivamos células en placas de 24 pozos tal como se describió en la metodología y realizamos una curva dosis-respuesta del siRNA (20, 40, 60 y 80 pmol de siRNA) utilizando 48 y 72 horas de incubación después de la transfección del siRNA. Nuestros resultados por la RT-PCR convencional muestran que no logramos disminuir la expresión de la AC9. Dado que la reducción en la expresión del siRNA difícilmente logra un 100% de eficiencia, nos preguntamos si la reducción del mensajero era enmascarada en la amplificación por la RT-PCR convencional. Por lo tanto, evaluamos cuantitativamente la expresión de la AC9 por la metodología de la PCR en tiempo real esperando que encontráramos una reducción más evidente en la expresión de dicho mensajero. Sin embargo, confirmamos que el tratamiento con siRNA era incapaz de silenciar la expresión del ARNm de la AC9 (Figura 16).

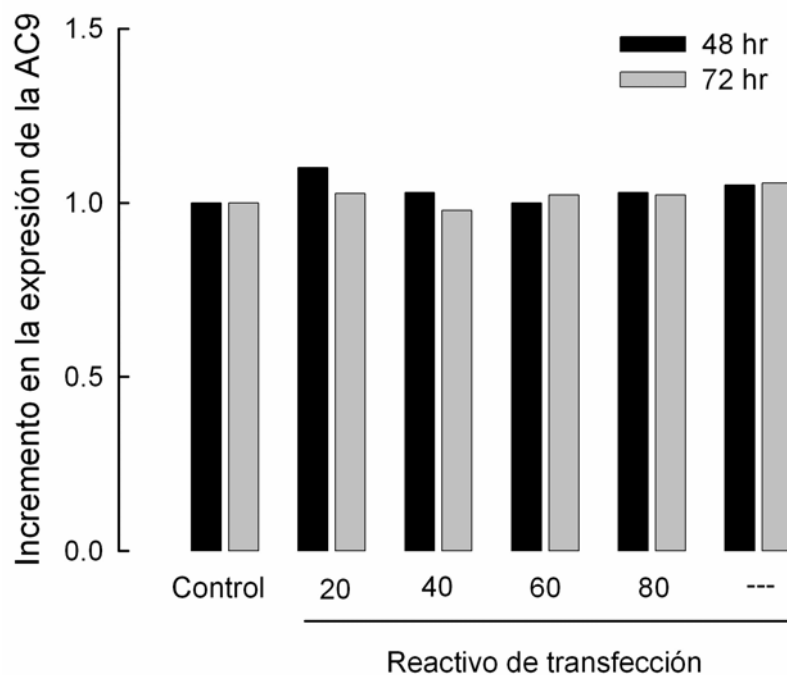


Figure 16: PCR en tiempo real de la expresión del ARNm de la AC9 tratada con siRNA AC9. Las células GT1-7 fueron tratadas con el siRNA dirigido contra la AC9 (20, 40, 60 y 80 pmol/pozo, respectivamente) combinado con el reactivo de transfección. También se muestra el control que corresponde a células sin tratar con siRNA en ausencia y presencia de reactivo de transfección.

Dado que encontramos que dichos tratamientos no lograron disminuir la expresión génica de la AC9, nos preguntamos si el mecanismo de transfección utilizado era el adecuado para inducir la entrada del siRNA. Puesto que no es posible aumentar la dosis del reactivo de transfección porque produjo un efecto tóxico en las células concluimos que era necesario evaluar si en la dosis no tóxica de reactivo de transfección lograba transfectar a un gen reportero que pudiese indicar si la transfección fue exitosa.

Para probar la eficiencia del reactivo de transfección utilizamos un plásmido que codifica para el gen de luciferasa. Se utilizó el mismo protocolo descrito en la metodología para transfectar al siRNA dirigido para la AC9 y encontramos que la luciferasa pudo ingresar a la célula y emitir una señal luminosa 600 veces mayor que en las células tratadas con el plasmido sin reactivo de transfección (Figura 17). Cuando combinamos el tratamiento de siRNA AC9 con el plásmido que codifica para la luciferasa encontramos una reducción en la señal (627.3 ± 8 vs 274.05 ± 22.5 Unidades) que sugiere una competencia entre ambas moléculas.

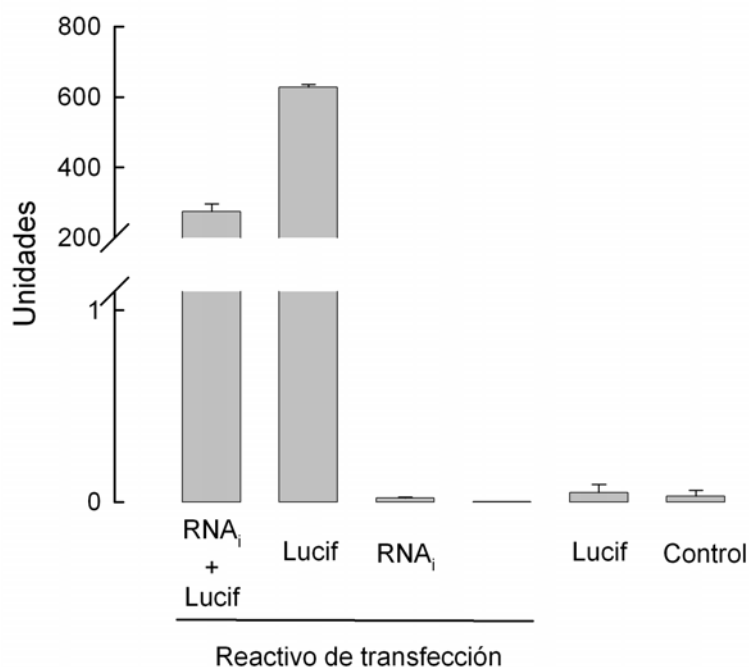


Figura 17: Ensayo de transfección de la luciferasa y/o siRNA dirigido contra la AC9. Las células GT1-7 fueron transfectadas con el siRNA AC9 y/o el plásmido que codifica para la luciferasa con y sin reactivo de transfección. Cada columna representa la media \pm E.E. de 3 experimentos independientes.

De este mismo experimento reservamos células GT1-7 con los tratamientos descritos previamente con la finalidad de analizar la expresión del ARNm de la AC9 y utilizamos como control positivo el gen casero β -actina. Nuevamente, los resultados muestran que no hubo cambios detectables en la expresión de la AC9 (Figura 18).

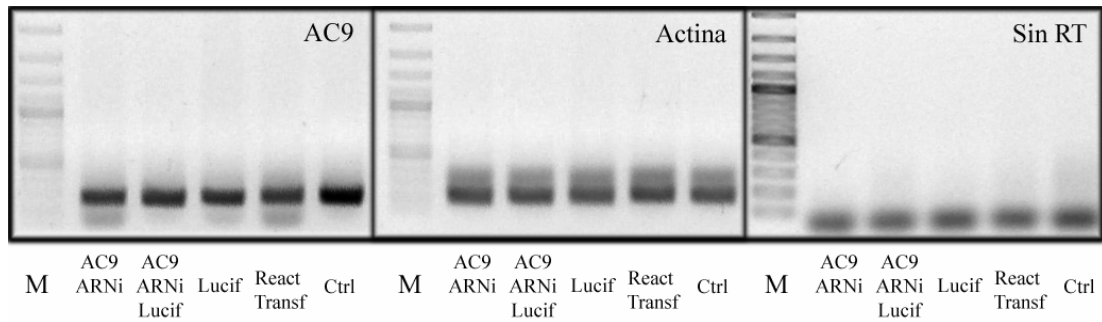


Figura 18: Las células GT1-7 expresan a la AC9 aún en presencia del siRNA AC9. La electroforesis de agarosa muestra los productos de la PCR del amplicón de la AC9, β -actina y el control negativo sin RT. Las células GT1 fueron tratadas con ARN de interferencia pequeños (ARNi) en ausencia y presencia del plásmido control que expresa a la región codificante de la luciferasa (Lucif), el reactivo de transfección (React Transf) y las células sin tratamiento (Ctrl).

Discusión

En el presente estudio se evaluó el patrón de expresión de las adenilato ciclasas (AC) en la línea celular inmortalizada de neuronas GnRHérgicas GT1-7, con la finalidad de encontrar el mecanismo que explique una acción del GABA que es disparada por receptores ionotrópicos y que desencadena efectos metabotrópicos a largo plazo. El GABA, actuando vía los receptores ionotrópicos GABA_A, tiene un efecto inhibitor tardío en la secreción de la GnRH que es ejercido por la inhibición sostenida de la formación del AMPc. Sin embargo, el mecanismo responsable de la respuesta a largo plazo permanece desconocido.

Se ha propuesto que el GABA actúa como un intermediario en la señalización central del sistema reproductivo a través de ejercer una acción directa en las neuronas GnRHérgicas. Estas neuronas expresan a los receptores ionotrópicos GABA_A (Jung *et al.*, 1998; Spergel *et al.*, 1999; Pape *et al.*, 2001), y reciben una profusa inervación de neuronas GABAérgicas (Leranth *et al.*, 1985) que resulta en una rápida despolarización de la membrana y el disparo de potenciales de acción (DeFazio *et al.*, 2002). El efecto estimulador del GABA es explicado porque el potencial de inversión del cloro en las células GT1 y posiblemente en neuronas GnRHérgicas *in situ*, es más positivo que el potencial de reposo de la membrana (Hales *et al.*, 1992; Hales *et al.*, 1994; DeFazio *et al.*, 2002). La activación de los receptores GABA_A a corto plazo aumenta la excitabilidad celular y a largo plazo produce un efecto inhibitor que se sostiene por varias decenas de minutos (Hales *et al.*, 1992; DeFazio *et al.*, 2002).

Estudios realizados *in vivo* apoyan la relevancia fisiológica de acciones tanto inhibitorias como excitadoras del GABA. Por un lado, se ha observado que se incrementan los niveles de la LH en respuesta al aumento del GABA cerca de las terminales de las neuronas GnRHérgicas (Bilger *et al.*, 2001). En contraste, una acción inhibitor predominante del GABA sobre las neuronas GnRHérgicas fue sugerida por estudios realizados en roedores y ovejas mostrando que la aplicación de antagonistas de los receptores GABA_A incrementa la liberación de la LH (Lamberts *et al.*, 1983; Adler y Crowley, 1986; Ferreira *et al.*, 1998).

Asimismo, se ha descrito que existe una relación inversa entre el contenido del GABA en el área preóptica y la liberación de la LH a la circulación sistémica (Jarry *et al.*, 1988; Robinson *et al.*, 1991; Herbison y Dyer, 1991). Mas aún, el GABA actúa suprimiendo la liberación de la LH/GnRH durante la infancia, y al remover esta supresión del eje reproductor desencadena tempranamente el inicio de la pubertad. Esto fue demostrado mediante la administración de la bicuculina (antagonista del receptor GABA_A) en el tercer ventrículo de monos rhesus (Keen *et al.*, 1999). En conjunto estas evidencias indican que el GABA juega un papel muy complejo en la regulación de la función reproductiva que incluye una acción inhibitoria persistente.

En la línea celular GT1-7 se han obtenido resultados similares, donde el GABA tiene un efecto dual caracterizado por un incremento transitorio de la estimulación seguida por una inhibición duradera de la secreción de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). La estimulación transitoria es disparada por la activación de los receptores GABA_A produciendo un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ a través de la apertura de canales de calcio operados por voltaje tipo L (Sun *et al.*, 1997), y un pico único de secreción de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994). La fase inicial de excitación es seguida por un decremento sostenido tanto en la $[Ca^{2+}]_i$ (Sun *et al.*, 1997) como en la liberación de la GnRH (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994), que se correlaciona con la reducción de la $[AMPC]_i$ y de la excitabilidad celular (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001). Todos los efectos anteriores tienen en común que son disparados por agonistas de los receptores GABA_A y bloqueados por antagonistas del receptor (Martínez de la Escalera *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1997; Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001).

A pesar de estos hallazgos, poco se conoce acerca la acción del GABA sobre la función GnRHérgica. En este trabajo hemos confirmado que el GABA disminuye sustancialmente la acumulación del AMPc en las células GT1-7, tal como se había mostrado previamente (Beltrán-Parrazal *et al.*, 2001). Más aún, hemos caracterizado la expresión de 8 diferentes isoformas de adenilato ciclasas membranales, incluyendo a la AC3 y la AC9 que son reguladas negativamente por el calcio.

Por la metodología de la PCR en tiempo real encontramos que las ACs reguladas negativamente por el calcio (AC3, AC5, AC6 y AC9) son 15 veces más abundantes que aquella regulada positivamente (AC1) sugiriendo que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ generado por la activación de los receptores GABA_A puede reducir marcadamente la síntesis del AMPc. De hecho, hemos demostrado que la activación farmacológica de los canales de calcio operados por voltaje tipo L (CCOVL) inhiben la acumulación del AMPc en menos del 20% de los niveles basales en 20 minutos. Además, nuestros resultados mostraron que la acción inhibitoria del GABA en la formación del AMPc es altamente dependiente del influjo del calcio sobre la inhibición del GABA ya que este fue bloqueado por el verapamil y parece ser mediada principalmente por la AC9 con una contribución menor de la AC3.

Esta conclusión es apoyada por el hallazgo de que la acción del GABA o el Bay K8644 se revierte por 4 diferentes bloqueadores de la calcineurina y en menor grado por el bloqueador de la cinasa dependiente del complejo calcio calmodulina tipo II (CamKII). El calcio inhibe la actividad de la AC9 al incrementar la tasa de desfosforilación por la calcineurina (Antoni *et al.*, 1998). Por otro lado, el calcio inhibe a la AC3 al incrementar la tasa de fosforilación mediada por la CamKII (Wayman *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1996). El papel central de la AC9 en el efecto del GABA también es evidenciado al demostrar que el GABA incrementa la actividad de fosfatasa en las células GT1-7, y este efecto no solo es bloqueado por inhibidores de la calcineurina sino que también se previene al disminuir el calcio libre extracelular o bloquear a los canales CCOVL.

Aún no se comprende del todo el mecanismo de regulación de la secreción en las neuronas GnRHérgicas. Existe abundante evidencia que implica al AMPc en la regulación de la liberación de la GnRH en células GT1-7 (Yoshida *et al.*, 2003) y en neuronas GnRHérgicas *in situ*, así como en la función reproductiva (Paruthiyil *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2005). La administración de análogos o la activación de las AC por forskolina incrementan marcadamente la secreción de la GnRH en las células GT1 (Martínez de la Escalera *et al.*, 1995).

Igualmente, al extender la vida media del AMPc con inhibidores no selectivos de las fosfodiesterasas 3-isobutil-1-metil xantina (IBMX) o con inhibidores específicos de la fosfodiesterasa tipo 4 (PDE4) rolipam y RS-25344 también incrementa la secreción de la GnRH (Sakakibara *et al.*, 1998). El decremento en los niveles del AMPc por la expresión de la forma constitutiva activa de la PDE4D1 dirigida genéticamente a las neuronas GnRHérgicas, no solo redujo la secreción de la LH (Paruthiyil *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2005) y la GnRH (Yoshida *et al.*, 2003) sino que también acortó la vida fértil en hembras generando múltiples quistes ováricos y eventualmente alteraciones en el metabolismo energético (Paruthiyil *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2005).

En este trabajo, demostramos que las células GT1-7 expresan un total de 8 isoformas con diferentes propiedades de regulación, lo cual sugiere que existe una compleja integración en la vía del AMPc en estas neuronas. Empleando un abordaje cuantitativo, nuestros resultados han ampliado un reporte previo que muestra la expresión de la AC1 que es regulada positivamente por el calcio, y las isoformas reguladas negativamente por el calcio (AC3, AC5/AC6) detectadas por *western blot* en las células GT1-7 (Krsmanovic *et al.*, 2001). Nosotros confirmamos la expresión a nivel de ARNm de la AC1, AC3, AC5, y AC6 y mostramos por primera vez la expresión de las isoformas insensibles al calcio AC2, AC4 y AC7 y otra isoforma regulada negativamente por calcio (AC9). También determinamos la proporción relativa de cada isoforma de la AC a nivel del ARNm debido a que no se cuenta con anticuerpos que reconozcan satisfactoriamente a todas las variantes de la AC.

Si bien este trabajo está enfocado a estudiar la participación de las ACs sensibles al calcio en la señalización del GABA, consideramos necesario analizar toda la colección de adenilato ciclasas expresadas en las neuronas GnRHérgicas. Las isoformas insensibles al calcio AC2, AC4 y AC7, están involucradas en la respuesta a señales aferentes, incluyendo aquellas que son mediadas por receptores acoplados a las proteínas G, tales como los receptores β 1-adrenérgicos (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992b) y D1 dopaminérgicos (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992c, Yoshida *et al.*, 2004) expresados en las células GT1 como en las neuronas GnRHérgicas *in situ* (Kordon *et al.*, 1994).

Aunque existen numerosos factores que influyen durante el procesamiento del ARNm, así como en la traducción que dará lugar a una proteína funcional y a que puede presentarse variaciones en estos procesos entre las isoformas de la AC, nuestros resultados sugieren que existe una preponderancia de las isoformas de la AC inhibidas por calcio a nivel del mensajero. Estos datos proponen que el efecto neto de la elevación en la $[Ca^{2+}]_i$ sobre la síntesis del AMPc es un reflejo de la acción combinada de todas las isoformas de la AC. En el presente trabajo mostramos que el patrón de expresión de las ACs es consistente con el efecto inhibitorio neto en la formación del AMPc observado en respuesta de una concentración elevada de la $[Ca^{2+}]_i$ mediada por la activación farmacológica de canales de calcio tipo L con BayK 8644 en las células GT1-7.

Nuestros resultados apoyan la participación de la AC3, AC5, AC6 y AC9 en el mecanismo de acción por el cual el GABA disminuye los niveles del AMPc utilizando al calcio como intermediario. De las cuatro isoformas de la AC que son inhibidas por el calcio, encontramos que la AC3 y la AC9 son expresadas en gran proporción. Estas isoformas de la AC son inhibidas por el calcio a través de la activación de la cinasa dependiente del complejo calcio-calmodulina tipo II ó CamKII (Wayman *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1996) y la calcineurina (Antoni *et al.*, 1995; Antoni *et al.*, 1998; Paterson *et al.*, 2000), respectivamente. Nuestros resultados muestran que el bloqueo farmacológico de la actividad de la calcineurina previene el efecto del GABA o el Bay K 8644 sobre el decremento en la $[AMPc]_i$, indicando que la calcineurina/AC9 juega un papel central en la vía de señalización GABAérgica.

Además de encontrar que el GABA es capaz de disminuir la actividad enzimática de la AC9 por al menos 20 minutos, también observamos que el GABA tiene efectos genómicos al aumentar la expresión del ARNm de la AC9 (Mayda González-Soto y colaboradores). Aunque los receptores GABA_A son típicamente asociados con eventos iónicos (generación de corrientes de cloro que cambian el potencial de membrana), recientemente han surgido evidencias que apoyan el papel de los receptores GABA_A en la regulación de varios transcritos (Doepner *et al.*, 2005; Martyniuk *et al.*, 2005).

Estos resultados sugieren la posibilidad de que el aumento en la expresión de la AC9 en respuesta a la exposición persistente del GABA en las neuronas GnRHérgicas. En consecuencia, estas células serían más susceptibles a un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y en consecuencia, desencadenar una caída dramática en la $[AMPc]_i$ y podría inhibir de forma sostenida la secreción de la GnRH. Este mecanismo podría explicar, entre otras cosas, la inhibición sostenida del GABA sobre las neuronas GnRHérgicas durante la infancia en primates no humanos (Keen *et al.*, 1999).

Recientemente hemos tratado de implementar la técnica de ARN de interferencia con la finalidad de explorar el papel de la AC9 en la señalización del GABA de forma complementaria a los estudios que hemos realizado por farmacología. Para este objetivo, adquirimos a través de *Santa Cruz Biotechnology* una mezcla de fragmentos pequeños de ARN (siRNA, small interference RNA) y realizamos curvas dosis-respuesta con este producto siguiendo la metodología sugerida por el proveedor con tiempos de incubación de 48 y 72 horas después de la transfección. Sin embargo, no detectamos cambios en la expresión de la AC9 utilizando la metodología de la RT-PCR convencional, así como en la PCR en tiempo real. Para analizar la eficiencia de transfección de esta técnica utilizamos un plásmido que contenía la región codificante del gen reportero lucifera y logramos obtener una señal luminosa en las células GT1-7 transfectadas con reactivos de transfección de dos marcas comerciales distintas (Invitrogen y *Santa Cruz Biotechnology*). Dado que el método de transfección es óptimo, inferimos que a pesar de que este siRNA comercial ingresa a la célula no es capaz de alterar la expresión de la AC9. Actualmente estamos trabajando en el diseño de siRNA dirigidos contra la AC9 con la intención de continuar la caracterización de esta isoformas en las células GT1-7.

Además de la participación de la calcineurina/AC9, tenemos evidencia que indica que la CamKII/AC3 también está involucrada al menos parcialmente en la señalización disparada por el GABA en las células GT1-7. Como dato interesante, la AC3 también se expresa en neuronas olfatorias y se ha descrito que las neuronas GnRHérgicas tienen sus orígenes en la placa olfatoria (Silverman *et al.*, 1994).

Otro ejemplo de esta correspondencia entre las células GT1 y la placa olfatoria es la expresión de canales catiónicos dependientes de nucleótidos cíclicos o canales CNG que son funcionales en ambos tipos celulares (Vitalis *et al.*, 2000, Blackman *et al.*, 2007). Además, se ha encontrado canales CNG se expresan en las neuronas GnRHérgicas *in situ* (El-Majdoubi y Weiner., 2002).

Recientemente se han generado trabajos que exploran el efecto neto de los receptores GABA_A en la excitabilidad de las neuronas GnRHérgicas. En estos trabajos, Suzzane Moenter y colaboradores encontraron que el GABA tiene un efecto excitador sin importar la edad, género o estado fisiológico (DeFazio *et al.*, 2002; Moenter y DeFazio., 2005). En contraste, Allan Herbison y colaboradores proponen que el GABA presenta un cambio en su efecto de excitador a inhibidor previo a la pubertad (Han *et al.*, 2002) y que en adultos el GABA tiene un efecto predominantemente inhibidor (Han *et al.*, 2004). A pesar de todos estos avances, continúa sin responderse la interrogante de cual es el efecto directo del GABA sobre las excitabilidad de las neuronas GnRHérgicas debido a la compleja interpretación de estos abordajes electrofisiológicos *in vivo*. A pesar de que ha habido grandes avances en el desarrollo de técnicas que permiten identificar con gran especificidad a las neuronas GnRHérgicas aún existen limitaciones técnicas que dificultan la disociación del efecto de las interneuronas aferentes a las neuronas GnRHérgicas (Han *et al.*, 2002; DeFazio *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004; Moenter y DeFazio. 2005). Recientemente se ha sugerido la participación de un asa de retroalimentación local entre el GABA y el glutamato que altera la excitabilidad celular en las neuronas GnRHérgicas (Chu y Moenter, 2005).

Conclusiones

En este trabajo proponemos un mecanismo novedoso donde el GABA dispara una cascada de segundos mensajeros que podría explicar el efecto inhibitor persistente del GABA sobre la secreción de la GnRH en las células GT1-7 (Figura 19). Nuestros resultados se resumen en las siguientes premisas:

- 1) La activación de los receptores $GABA_A$ producen la despolarización de la membrana e inducen un incremento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$ a través de los canales de calcio operados por voltaje tipo L (COV) (Sun *et al.*, 1997). Nuestros resultados muestran que: a) la entrada de calcio por los canales COV tipo L es suficiente para disminuir la $[AMPc]_i$ y b) que este aumento en calcio es necesario para que el GABA disminuya la acumulación del AMPc.
- 2) Las células GT1-7 expresan isoformas sensibles al calcio, incluyendo una gran proporción de las isoformas AC3 y AC9 que son reguladas negativamente por este catión.
- 3) El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inhibe la actividad de la AC3 y AC9 al ser fosforilada por la CamKII y desfosforilada por la calcineurina, respectivamente (Sunahara y Taussig., 2002). En este trabajo se demostró que la caída en la $[AMPc]_i$ mediada por el GABA es bloqueada por la calcineurina y disminuida por la inhibición de la CamKII.
- 4) El GABA incrementa la actividad de la calcineurina a través de un mecanismo dependiente de la entrada de calcio por canales COV tipo L en las células GT1-7.

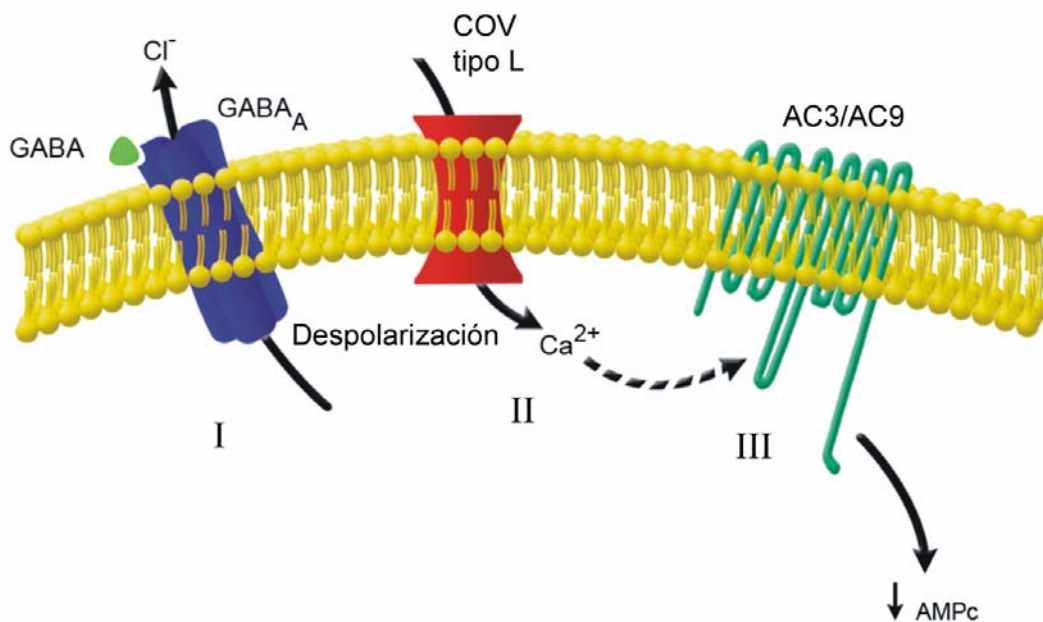


Figura 19: Mecanismo de acción propuesto para explicar la regulación GABAérgica de la actividad de las adenilato ciclasas en las células GT1-7.

Perspectivas

Este trabajo nos ha permitido identificar algunos elementos clave en la regulación GABAérgica de la actividad de las adenilato ciclasas y, por lo tanto, potencialmente entender como se lleva a cabo la disminución persistente de la secreción de la GnRH mediada por el GABA en las células GT1-7. Este trabajo es novedoso y de gran interés para el campo de la neuroendocrinología puesto que permite describir a nivel molecular la señalización del GABA sobre las neuronas reproductivas. Queda por determinar el papel que juega la AC3 y la AC9 como moduladores de la secreción de GnRH. En este trabajo se demostró que la AC3 y la AC9 están presentes abundantemente en las células GT1 y que están involucradas la caída en la acumulación de la $[AMPc]_i$ mediado por el GABA. Queda por determinar si la ausencia de dichas isoformas modificaría la acumulación del AMPc y la liberación de la GnRH. Para este fin, se implementaría el uso de fragmentos pequeños de RNA de interferencia (siRNA, *small interference RNA*) dirigidos a la AC3 y la AC9, así como la combinación de estos. Para poder disecar el efecto de cada componente de la vía de señalización del GABA y otros moduladores sería de utilidad monitorear la secreción de la GnRH por medio de un inmunoensayo enzimático. Además, sería de gran utilidad que este método sea implementado por el laboratorio puesto que permitiría una amplia caracterización del GABA y otros neurotransmisores sobre la secreción de la GnRH con un costo económico bajo. A la par, tenemos datos preliminares que muestran que el GABA tiene un efecto genómico al alterar la expresión de las adenilato ciclasas sensibles al calcio y nos interesa explorar como afectan estos cambios a la acumulación del AMPc y la secreción de la GnRH. Más aún, dado que nuestro objetivo final es extrapolar esta información a un animal completo, un primer acercamiento sería explorar que isoformas de la AC se encuentran presentes en las neuronas GnRHérgicas *in vivo*. Para este objetivo se puede utilizar la técnica de hibridación *in situ* para determinar la expresión de las ACs en el hipotálamo, así como realizar simultáneamente una inmunohistoquímica para determinar la co-localización de estas isoformas de la AC en las neuronas GnRHérgicas.

Referencias

- 1 Adler BA, Crowley WR. Evidence for gamma-aminobutyric acid modulation of ovarian hormonal effects on luteinizing hormone secretion and hypothalamic catecholamine activity in the female rat. *Endocrinology* 1986;118(1):91-7.
- 2 Antoni FA, Barnard RJ, Shipston MJ, Smith SM, Simpson J, Paterson JM. Calcineurin feedback inhibition of agonist-evoked cAMP formation. *J Biol Chem* 1995;270(47):28055-61.
- 3 Antoni FA, Palkovits M, Simpson J, Smith SM, Leitch AL, Rosie R, Fink G, Paterson JM. Ca²⁺/calcineurin-inhibited adenylyl cyclase, highly abundant in forebrain regions, is important for learning and memory. *J Neurosci* 1998;18(23):9650-61.
- 4 Bakalyar HA, Reed RR. Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* 1990;250(4986):1403-6.
- 5 Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 1978;202(4368):631-3.
- 6 Beltran-Parrazal L, Noris G, Clapp C, Martinez de la Escalera G. GABA inhibition of immortalized gonadotropin-releasing hormone neuronal excitability involves GABA(A) receptors negatively coupled to cyclic adenosine monophosphate formation. *Endocrine* 2001;14(2):189-95.
- 7 Bilger M, Heger S, Brann DW, Paredes A, Ojeda SR. A conditional tetracycline-regulated increase in Gamma amino butyric acid production near luteinizing hormone-releasing hormone nerve terminals disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* 2001;142(5):2102-14.
- 8 Billinton A, Ige AO, Bolam JP, White JH, Marshall FH, Emson PC. Advances in the molecular understanding of GABA(B) receptors. *Trends Neurosci* 2001;24(5):277-82.
- 9 Blackman BE, Yoshida H, Paruthiyil S, Weiner RI. Frequency of intrinsic pulsatile GnRH secretion is regulated by the expression of cyclic nucleotide gated (CNG) channels in GT1 Cells. *Endocrinology* 2007.
- 10 Bless EP, Westaway WA, Schwarting GA, Tobet SA. Effects of gamma-aminobutyric acid(A) receptor manipulation on migrating gonadotropin-releasing hormone neurons through the entire migratory route in vivo and in vitro. *Endocrinology* 2000;141(3):1254-62.
- 11 Bless EP, Walker HJ, Yu KW, Knoll JG, Moenter SM, Schwarting GA, Tobet SA. Live view of gonadotropin-releasing hormone containing neuron migration. *Endocrinology* 2005;146(1):463-8.
- 12 Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21(1):16-9.
- 13 Bosma MM. Ion channel properties and episodic activity in isolated immortalized gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. *J Membr Biol* 1993;136(1):85-96.
- 14 Bowery NG, Smart TG. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S109-19.
- 15 Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(1):79-84.

- 16 Campbell RE, Han SK, Herbison AE. Biocytin filling of adult gonadotropin-releasing hormone neurons in situ reveals extensive, spiny, dendritic processes. *Endocrinology* 2005;146(3):1163-9.
- 17 Chabardes D, Firsov D, Aarab L, Clabecq A, Bellanger AC, Siaume-Perez S, Elalouf JM. Localization of mRNAs encoding Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclases along the renal tubule. Functional consequences for regulation of the cAMP content. *J Biol Chem* 1996;271(32):19264-71.
- 18 Chabardes D, Imbert-Teboul M, Elalouf JM. Functional properties of Ca²⁺-inhibitable type 5 and type 6 adenylyl cyclases and role of Ca²⁺ increase in the inhibition of intracellular cAMP content. *Cell Signal* 1999;11(9):651-63.
- 19 Chang DC, Reppert SM. The circadian clocks of mice and men. *Neuron* 2001;29(3):555-8.
- 20 Chebib M, Johnston GA. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26(11):937-40.
- 21 Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 2000;289(5479):625-8.
- 22 Chern Y. Regulation of adenylyl cyclase in the central nervous system. *Cell Signal* 2000;12(4):195-204.
- 23 Choi EJ, Wong ST, Hinds TR, Storm DR. Calcium and muscarinic agonist stimulation of type I adenylyl cyclase in whole cells. *J Biol Chem* 1992;267(18):12440-2.
- 24 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9.
- 25 Chu Z, Moenter SM. Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors modulates GABAergic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons and alters their firing rate: a possible local feedback circuit. *J Neurosci* 2005;25(24):5740-9.
- 26 Cooper DM. Inhibition of adenylyl cyclase by Ca²⁺--a counterpart to stimulation by Ca²⁺/calmodulin. *Biochem J* 1991;278 (Pt 3):903-4.
- 27 Cooper DM, Mons N, Karpen JW. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 1995;374(6521):421-4.
- 28 Cooper DM. Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J* 2003;375(Pt 3):517-29.
- 29 De Jeu M, Pennartz C. Circadian modulation of GABA function in the rat suprachiasmatic nucleus: excitatory effects during the night phase. *J Neurophysiol* 2002;87(2):834-44.
- 30 Decavel C, Van den Pol AN. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J Comp Neurol* 1990;302(4):1019-37.
- 31 DeFazio RA, Heger S, Ojeda SR, Moenter SM. Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol* 2002;16(12):2872-91.
- 32 Desaubry L, Shoshani I, Johnson RA. Inhibition of adenylyl cyclase by a family of newly synthesized adenine nucleoside 3'-polyphosphates. *J Biol Chem* 1996;271(24):14028-34.
- 33 Dessauer CW, Gilman AG. Purification and characterization of a soluble form of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1996;271(28):16967-74.

- 34 Dessauer CW, Gilman AG. The catalytic mechanism of mammalian adenylyl cyclase. Equilibrium binding and kinetic analysis of P-site inhibition. *J Biol Chem* 1997;272(44):27787-95.
- 35 Dierschke DJ, Bhattacharya AN, Atkinson LE, Knobil E. Circoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 1970;87(5):850-3.
- 36 Doepner RF, Geigerseder C, Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Calandra RS, Raemsch R, Fohr K, Kunz L, Mayerhofer A. Insights into GABA receptor signalling in TM3 Leydig cells. *Neuroendocrinology* 2005;81(6):381-90.
- 37 Drouva SV, Epelbaum J, Hery M, Tapia-Arancibia L, Laplante E, Kordon C. Ionic channels involved in the LHRH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1981;32(3):155-62.
- 38 El-Majdoubi M, Weiner RI. Localization of olfactory cyclic nucleotide-gated channels in rat gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2002;143(6):2441-4.
- 39 Feigenspan A, Bormann J. GABA-gated Cl⁻ channels in the rat retina. *Prog Retin Eye Res* 1998;17(1):99-126.
- 40 Ferreira SA, Hileman SM, Kuehl DE, Jackson GL. Effects of dialyzing gamma-aminobutyric acid receptor antagonists into the medial preoptic and arcuate ventromedial region on luteinizing hormone release in male sheep. *Biol Reprod* 1998;58(4):1038-46.
- 41 Fink G. Neuroendocrinology regulation of pituitary function. En: Conn PM, Freeman ME, editores. *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Totowa, NJ: Humana Press. 2000. p 107-33.
- 42 Fiumelli H, Woodin MA. Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development. *Curr Opin Neurobiol* 2007;17(1):81-6.
- 43 Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 2001;105(4):521-32.
- 44 Gautier-Courteille C, Salanova M, Conti M. The olfactory adenylyl cyclase III is expressed in rat germ cells during spermiogenesis. *Endocrinology* 1998;139(5):2588-99.
- 45 Gomez F, la Fleur SE, Weiner RI, Dallman MF, El Majdoubi M. Decreased gonadotropin-releasing hormone neuronal activity is associated with decreased fertility and dysregulation of food intake in the female GPR-4 transgenic rat. *Endocrinology* 2005;146(9):3800-8.
- 46 Gore AC. Introduction. En: Gore AC, editor. *GnRH: The master molecule of reproduction*. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers. 2002. p 1-6.
- 47 Guillou JL, Rose GM, Cooper DM. Differential activation of adenylyl cyclases by spatial and procedural learning. *J Neurosci* 1999;19(14):6183-90.
- 48 Hales TG, Kim H, Longoni B, Olsen RW, Tobin AJ. Immortalized hypothalamic GT1-7 neurons express functional gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Pharmacol* 1992;42(2):197-202.
- 49 Hales TG, Sanderson MJ, Charles AC. GABA has excitatory actions on GnRH-secreting immortalized hypothalamic (GT1-7) neurons. *Neuroendocrinology* 1994;59(3):297-308.

- 50 Hammond DL. GABA(B) receptors: new tricks by an old dog. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(1):26-30.
- 51 Han SK, Abraham IM, Herbison AE. Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. *Endocrinology* 2002;143(4):1459-66.
- 52 Han SK, Todman MG, Herbison AE. Endogenous GABA release inhibits the firing of adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2004;145(2):495-9.
- 53 Hanoune J, Pouille Y, Tzavara E, Shen T, Lipskaya L, Miyamoto N, Suzuki Y, Defer N. Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 1997;128(1-2):179-94.
- 54 Heger S, Seney M, Bless E, Schwarting GA, Bilger M, Mungenast A, Ojeda SR, Tobet SA. Overexpression of glutamic acid decarboxylase-67 (GAD-67) in gonadotropin-releasing hormone neurons disrupts migratory fate and female reproductive function in mice. *Endocrinology* 2003;144(6):2566-79.
- 55 Herbison AE, Dyer RG. Effect on luteinizing hormone secretion of GABA receptor modulation in the medial preoptic area at the time of proestrous luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology* 1991;53(3):317-20.
- 56 Hill J, Howlett A, Klein C. Nitric oxide selectively inhibits adenylyl cyclase isoforms 5 and 6. *Cell Signal* 2000;12(4):233-7.
- 57 Hurley JH. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1999;274(12):7599-602.
- 58 Ishikawa Y, Grant BS, Okumura S, Schwencke C, Yamamoto M. Immunodetection of adenylyl cyclase protein in tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2000;162(1-2):107-12.
- 59 Iwami G, Kawabe J, Ebina T, Cannon PJ, Homcy CJ, Ishikawa Y. Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J Biol Chem* 1995;270(21):12481-4.
- 60 Jaiswal BS, Conti M. Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 2001;276(34):31698-708.
- 61 Jarry H, Perschl A, Wuttke W. Further evidence that preoptic anterior hypothalamic GABAergic neurons are part of the GnRH pulse and surge generator. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988;118(4):573-9.
- 62 Jarry H, Hirsch B, Leonhardt S, Wuttke W. Amino acid neurotransmitter release in the preoptic area of rats during the positive feedback actions of estradiol on LH release. *Neuroendocrinology* 1992;56(2):133-40.
- 63 Jennes L, Stumpf WE, Tappaz ML. Anatomical relationships of dopaminergic and GABAergic systems with the GnRH-systems in the septo-hypothalamic area. Immunohistochemical studies. *Exp Brain Res* 1983;50(1):91-9.
- 64 Jung H, Shannon EM, Fritschy JM, Ojeda SR. Several GABAA receptor subunits are expressed in LHRH neurons of juvenile female rats. *Brain Res* 1998;780(2):218-29.
- 65 Kaila K. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1994;42(4):489-537.
- 66 Kardos J. Recent advances in GABA research. *Neurochem Int* 1999;34(5):353-8.
- 67 Kasuya E, Nyberg CL, Mogi K, Terasawa E. A role of gamma-amino butyric 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* 1999;140(2):705-12.

- 68 Keen KL, Burich AJ, Mitsushima D, Kasuya E, Terasawa E. Effects of pulsatile infusion of the GABA(A) receptor blocker bicuculline on the onset of puberty in female rhesus monkeys. *Endocrinology* 1999;140(11):5257-66.
- 69 Kordon C, Drouva SV, Martínez de la Escalera G, Weiner RI. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: Knobil E, Niell JD, editores. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. 1994. p 1621-82.
- 70 Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Merelli F, Dufour SM, Virmani MA, Catt KJ. Calcium signaling and episodic secretion of gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(18):8462-6.
- 71 Krsmanovic LZ, Mores N, Navarro CE, Tomic M, Catt KJ. Regulation of Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclase in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol* 2001;15(3):429-40.
- 72 Kudlacek O, Mitterauer T, Nanoff C, Hohenegger M, Tang WJ, Freissmuth M, Kleuss C. Inhibition of adenylyl and guanylyl cyclase isoforms by the antiviral drug foscarnet. *J Biol Chem* 2001;276(5):3010-6.
- 73 Lamberts R, Vijayan E, Graf M, Mansky T, Wuttke W. Involvement of preoptic-anterior hypothalamic GABA neurons in the regulation of pituitary LH and prolactin release. *Exp Brain Res* 1983;52(3):356-62.
- 74 Leranath C, Segura LM, Palkovits M, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. The LH-RH-containing neuronal network in the preoptic area of the rat: demonstration of LH-RH-containing nerve terminals in synaptic contact with LH-RH neurons. *Brain Res* 1985;345(2):332-6.
- 75 Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR. Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem* 2003;278(18):15922-6.
- 76 Lu J, Karadshah M, Delpire E. Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol* 1999;39(4):558-68.
- 77 MacColl G, Quinton R, Bouloux PM. GnRH neuronal development: insights into hypogonadotrophic hypogonadism. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13(3):112-8.
- 78 Martina M, Royer S, Pare D. Cell-type-specific GABA responses and chloride homeostasis in the cortex and amygdala. *J Neurophysiol* 2001;86(6):2887-95.
- 79 Martínez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI. Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992a;89(5):1852-5.
- 80 Martínez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI. Beta 1-adrenergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology* 1992b;131(3):1397-402.
- 81 Martínez de la Escalera G, Gallo F, Choi AL, Weiner RI. Dopaminergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via D1-receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology* 1992c;131(6):2965-71.
- 82 Martínez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI. Biphasic gabaergic regulation of GnRH secretion in GT1 cell lines. *Neuroendocrinology* 1994;59(5):420-5.

- 83 Martínez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI. Signaling pathways involved in GnRH secretion in GT1 cells. *Neuroendocrinology* 1995;61(3):310-7.
- 84 Martínez de la Escalera G, Clapp C. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion: insights from GT1 immortal GnRH neurons. *Arch Med Res* 2001;32(6):486-98.
- 85 Martínez de la Escalera G, Jacobi JS, Martín C, Clapp C. Reproducción sexual: regulación central del eje neuroendócrino. En: Javier Velásquez Moctezuma, editor. *Temas selectos de Neurociencias III*. Ciudad de México: Universidad Autónoma de México. 2004. p 203-212.
- 86 Marty A, Llano I. Excitatory effects of GABA in established brain networks. *Trends Neurosci* 2005;28(6):284-9.
- 87 Martyniuk CJ, Crawford AB, Hogan NS, Trudeau VL. GABAergic modulation of the expression of genes involved in GABA synaptic transmission and stress in the hypothalamus and telencephalon of the female goldfish (*Carassius auratus*). *J Neuroendocrinol* 2005;17(5):269-75.
- 88 Masotto C, Wisniewski G, Negro-Vilar A. Different gamma-aminobutyric acid receptor subtypes are involved in the regulation of opiate-dependent and independent luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 1989;125(1):548-53.
- 89 Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 1990;5(1):1-10.
- 90 Mitsushima D, Hei DL, Terasawa E. gamma-Aminobutyric acid is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing hormone-releasing hormone before the onset of puberty. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(1):395-9.
- 91 Mitsushima D, Jinnai K, Kimura F. Possible role of the gamma-aminobutyric acid-A receptor system in the timing of the proestrous luteinizing hormone surge in rats. *Endocrinology* 1997;138(5):1944-8.
- 92 Mitsushima D, Shwe TT, Funabashi T, Shinohara K, Kimura F. GABA release in the medial preoptic area of cyclic female rats. *Neuroscience* 2002;113(1):109-14.
- 93 Moenter SM, DeFazio RA. Endogenous gamma-aminobutyric acid can excite gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2005;146(12):5374-9.
- 94 Nicholls JG. Indirect mechanisms of synaptic transmission. En: Nicholls JG, Martin AR, Wallace B G, Fuchs PA, editores. *From neuron to brain*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. 2001. p 177-97.
- 95 Ojeda SR, Heger S. New thoughts on female precocious puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14(3):245-56.
- 96 Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V, Mungenast AE. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* 2006;147(3):1166-74.
- 97 Olanas MC, Ingianni A, Onali P. Role of G protein betagamma subunits in muscarinic receptor-induced stimulation and inhibition of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb. *J Neurochem* 1998;70(6):2620-7.
- 98 Ondo JG. Gamma-aminobutyric acid effects on pituitary gonadotropin secretion. *Science* 1974;186(4165):738-9.
- 99 Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition?. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(9): 715-27

- 100 Pape JR, Skynner MJ, Sim JA, Herbison AE. Profiling gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor subunit mRNA expression in postnatal gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons of the male mouse with single cell RT-PCR. *Neuroendocrinology* 2001;74(5):300-8.
- 101 Paruthiyil S, e LMM, Conti M, Weiner RI. Phosphodiesterase expression targeted to gonadotropin-releasing hormone neurons inhibits luteinizing hormone pulses in transgenic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(26):17191-6.
- 102 Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 2001;269(1-2):13-25.
- 103 Paterson JM, Smith SM, Simpson J, Grace OC, Sosunov AA, Bell JE, Antoni FA. Characterisation of human adenylyl cyclase IX reveals inhibition by Ca(2+)/Calcineurin and differential mRNA polyadenylation. *J Neurochem* 2000;75(4):1358-67.
- 104 Plant TM, Barker-Gibb ML. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. *Hum Reprod Update* 2004;10(1):67-77.
- 105 Pohl CR, Knobil E. The role of the central nervous system in the control of ovarian function in higher primates. *Annu Rev Physiol* 1982;44:583-93.
- 106 Pompolo S, Pereira A, Kaneko T, Clarke IJ. Seasonal changes in the inputs to gonadotropin-releasing hormone neurones in the ewe brain: an assessment by conventional fluorescence and confocal microscopy. *J Neuroendocrinol* 2003;15(5):538-45.
- 107 Premont RT, Matsuoka I, Mattei MG, Pouille Y, Defer N, Hanoune J. Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1996;271(23):13900-7.
- 108 Robinson JE, Kendrick KM, Lambart CE: Changes in the release of γ -aminobutyric acid and catecholamines in the preoptic/septal area prior to and during the preovulatory surge of luteinizing hormone in the ewe. *J Neuroendocrinol* 1991;3:393-399.
- 109 Sakakibara H, Conti M, Weiner RI. Role of phosphodiesterases in the regulation of gonadotropin- releasing hormone secretion in GT1 cells. *Neuroendocrinology* 1998;68(6):365-73.
- 110 Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 1989;338(6211):161-4.
- 111 Silverman AJ, Jhamandas J, Renaud LP. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J Neurosci* 1987;7(8):2312-9.
- 112 Silverman AJ, Livne I, Witkin JW. The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry and *in situ* hybridization. En: Knobil E, Niell JD, editores. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. 1994. p 1683-98.
- 113 Simeone TA, Donevan SD, Rho JM. Molecular biology and ontogeny of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol* 2003;18(1):39-48; discussion 49.
- 114 Sinclair ML, Wang XY, Mattia M, Conti M, Buck J, Wolgemuth DJ, Levin LR. Specific expression of soluble adenylyl cyclase in male germ cells. *Mol Reprod Dev* 2000;56(1):6-11.

- 115 Spergel DJ, Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Catt KJ. L-type Ca²⁺ channels mediate joint modulation by gamma-amino-butyric acid and glutamate of [Ca²⁺]_i and neuropeptide secretion in immortalized gonadotropin-releasing hormone neurons. *Neuroendocrinology* 1995;61(5):499-508.
- 116 Spergel DJ, Kruth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH. GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* 1999;19(6):2037-50.
- 117 Steegborn C, Litvin TN, Levin LR, Buck J, Wu H. Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12(1):32-7.
- 118 Stevens T, Nakahashi Y, Cornfield DN, McMurtry IF, Cooper DM, Rodman DM. Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase modulates pulmonary artery endothelial cell cAMP content and barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(7):2696-700.
- 119 Sun W, Jarry H, Wuttke W, Kim K. Gonadotropin releasing hormone modulates gamma-aminobutyric acid-evoked intracellular calcium increase in immortalized hypothalamic gonadotropin releasing hormone neurons. *Brain Res* 1997;747(1):70-7.
- 120 Sunahara RK, Taussig R. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* 2002;2(3):168-84.
- 121 Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG. Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 1994;269(8):6093-100.
- 122 Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* 2001;22(1):111-51.
- 123 Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science* 1997;278(5345):1907-16.
- 124 Tesmer JJ, Sprang SR. The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol* 1998;8(6):713-9.
- 125 Tesmer JJ, Dessauer CW, Sunahara RK, Murray LD, Johnson RA, Gilman AG, Sprang SR. Molecular basis for P-site inhibition of adenylyl cyclase. *Biochemistry* 2000;39(47):14464-71.
- 126 Tesmer JJ. A seminal study of soluble adenylyl cyclase. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12(1):7-8.
- 127 Tobet SA, Bless EP, Schwarting GA. Developmental aspect of the gonadotropin-releasing hormone system. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185(1-2):173-84.
- 128 Todman MG, Han SK, Herbison AE. Profiling neurotransmitter receptor expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays. *Neuroscience* 2005;132(3):703-12.
- 129 Vardi N, Zhang LL, Payne JA, Sterling P. Evidence that different cation chloride cotransporters in retinal neurons allow opposite responses to GABA. *J Neurosci* 2000;20(20):7657-63.
- 130 Vijayan E, McCann SM. The effects of intraventricular injection of gamma-aminobutyric acid (GABA) on prolactin and gonadotropin release in conscious female rats. *Brain Res* 1978;155(1):35-43.
- 131 Villacres EC, Wu Z, Hua W, Nielsen MD, Watters JJ, Yan C, Beavo J, Storm DR. Developmentally expressed Ca(2+)-sensitive adenylyl cyclase activity is disrupted in the brains of type I adenylyl cyclase mutant mice. *J Biol Chem* 1995;270(24):14352-7.

- 132 Vitalis EA, Costantin JL, Tsai PS, Sakakibara H, Paruthiyil S, Iiri T, Martini JF, Taga M, Choi AL, Charles AC and others. Role of the cAMP signaling pathway in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in GT1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(4):1861-6.
- 133 Wang H, Storm DR. Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *Mol Pharmacol* 2003;63(3):463-8.
- 134 Wayman GA, Impey S, Storm DR. Ca²⁺ inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo. *J Biol Chem* 1995;270(37):21480-6.
- 135 Wayman GA, Wei J, Wong S, Storm DR. Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo. *Mol Cell Biol* 1996;16(11):6075-82.
- 136 Wei J, Wayman G, Storm DR. Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *J Biol Chem* 1996;271(39):24231-5.
- 137 Weiner RI, Wetsel W, Goldsmith P, Martinez de la Escalera G, Windle J, Padula C, Choi A, Negro-Vilar A, Mellon P. Gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Front Neuroendocrinol* 1992;13(2):95-119.
- 138 Witkin JW, Paden CM, Silverman AJ. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology* 1982;35:429-438.
- 139 Witkin JW, Silverman AJ. Synaptology of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in rat preoptic area. *Peptides* 1985;6(2):263-71.
- 140 Wong ST, Trinh K, Hacker B, Chan GC, Lowe G, Gaggar A, Xia Z, Gold GH, Storm DR. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 2000;27(3):487-97.
- 141 Woodward RM, Polenzani L, Miledi R. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. I. Effects of Cl⁻ channel inhibitors. *Mol Pharmacol* 1992;42(1):165-73.
- 142 Wray S, Nieburgs A, Elkabes S. Spatiotemporal cell expression of luteinizing hormone-releasing hormone in the prenatal mouse: evidence for an embryonic origin in the olfactory placode. *Brain Res Dev Brain Res* 1989;46(2):309-18.
- 143 Wu GC, Lai HL, Lin YW, Chu YT, Chern Y. N-glycosylation and residues Asn805 and Asn890 are involved in the functional properties of type VI adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 2001;276(38):35450-7.
- 144 Yoshida H, Beltran-Parrazal L, Butler P, Conti M, Charles AC, Weiner RI. Lowering cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (cAMP) levels by expression of a cAMP-specific phosphodiesterase decreases intrinsic pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion from GT1 cells. *Mol Endocrinol* 2003;17(10):1982-90.
- 145 Yoshida H, Paruthiyil S, Butler P, Weiner RI. Role of cAMP signaling in the mediation of dopamine-induced stimulation of GnRH secretion via D1 dopamine receptors in GT1-7 cells. *Neuroendocrinology* 2004;80(1):2-10.
- 146 Zimmermann G, Taussig R. Protein kinase C alters the responsiveness of adenylyl cyclases to G protein alpha and betagamma subunits. *J Biol Chem* 1996;271(43):27161-6.
- 147** Zippin JH, Levin LR, Buck J. CO₂/HCO₃⁻-responsive soluble adenylyl cyclase as a putative metabolic sensor. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12(8):366-70.