

03097
1



... a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e imp
contenido de mi trabajo recepc:
NOMBRE: LUIS BELTRÁN
PARRAZAL
FECHA: 18-06-2003
LUGAR: PA. Beltrán

Efectos del GABA sobre la secreción de GnRH en neuronas GT17

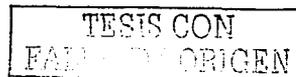
Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Neurobiología) presenta el:

M. en C. Luis Beltrán Parrazal

Tutor: Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera.

Junio, 2003

A





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.

Resumen

El ácido γ aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso responsable de la regulación de múltiples circuitos neuronales, entre los que se encuentra el sistema GnRHérgico. El sistema GnRHérgico está constituido por un grupo de neuronas que sintetizan a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La GnRH se encarga de modular la síntesis y la secreción de la hormona estimulante de los folículos (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), las cuales participan en la maduración y liberación del espermatozoide en el macho y de los óvulos en la hembra.

Recientemente se ha sugerido que el GABA tiene un papel dinámico durante el desarrollo sexual en los mamíferos. Algunos experimentos desarrollados en primates no humanos sugieren que en el periodo previo a la pubertad, el sistema GABAérgico ejerce una inhibición tónica sobre el sistema GnRHérgico. Por el contrario, durante la pubertad esta inhibición tónica disminuye permitiendo que las neuronas GnRHérgicas aumenten la secreción de GnRH. Los estudios anatómicos realizados en rebanadas de hipotálamo de rata muestran que las neuronas GABAérgicas inervan directamente a las GnRHérgicas. Además, los experimentos realizados en neuronas GnRHérgicas inmortalizadas (denominadas GT1) y en cultivos de neuronas hipotalámicas, han demostrado que la aplicación de GABA tiene un efecto bifásico sobre la secreción de GnRH, es decir, produce una fase estimulante rápida pero transitoria, seguida por una fase de inhibición tónica de la liberación de esta hormona.

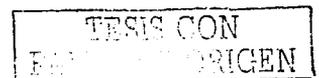
El efecto estimulante del GABA en las células GT1 ha sido bien caracterizado y se sabe que está mediado por el receptor $GABA_A$, que al ser activado provoca una corriente saliente de Cl^- que despolariza la membrana. Sin embargo, la fase de inhibición no ha sido estudiada en detalle, pero estudios previos sugieren que el receptor $GABA_B$ podría estar involucrado en esta fase. Se sabe que los receptores $GABA_B$ están acoplados a una proteína G inhibitoria

(G_{ivo}), que tiene la capacidad de modular la actividad de la adenilato ciclasa y de los canales de K⁺ (tipo GIRK) y Ca²⁺ dependientes de voltaje.

El objetivo de esta tesis fue probar si la activación del receptor GABA_B era capaz de disminuir la concentración de AMPc y regular la entrada de Ca²⁺ provocada por la despolarización de la membrana en células GT1.

Para determinar si la presencia de GABA modifica la concentración de AMPc, se incubaron células GnRHérgicas GT₁₋₇ en diferentes concentraciones de GABA (1 nM-10 μM). Esta manipulación provocó la disminución de la acumulación de AMPc de manera dependiente de la concentración. El efecto fue bloqueado por bicuculina y mimetizado por muscimol pero no por baclofén. Con el objeto de analizar el efecto del GABA sobre la entrada de Ca²⁺ provocada por la despolarización con alto K⁺, las células GT₁₋₇ fueron incubadas con fura-2 AM, y expuestas a una solución despolarizante (35 mM K⁺) en ausencia o presencia de GABA. La estimulación con alto K⁺ provocó un cambio transitorio de Ca²⁺ de hasta 150 nM. Por el contrario, cuando este estímulo se aplicó en presencia de GABA (10 μM) o muscimol (10 μM), la amplitud del transitorio de Ca²⁺ se redujo hasta en un 50%. Este efecto inhibitorio fue bloqueado por forskolina (20 μM) y por 8-Br-AMPc (1 mM).

El principal hallazgo de esta tesis es que el GABA inhibe la formación de AMPc en las células GT₁₋₇ a través de la estimulación del receptor GABA_A y no del receptor GABA_B. El mecanismo molecular de acción a través del cual el receptor GABA_A disminuye la concentración de AMPc queda por ser determinado. Además se observó que la estimulación del receptor GABA_A regula la entrada de Ca²⁺ en las células GT₁₋₇ cuando estas son despolarizadas y que el efecto del GABA sobre la amplitud del transitorio de Ca²⁺ evocado por la despolarización es bloqueado al inducir un aumento de la concentración intracelular de AMPc. En conclusión, en esta tesis se demostró por primera vez, que la estimulación del receptor ionotrópico GABA_A de las neuronas GnRHérgicas, es capaz de inhibir la formación de AMPc y modificar la amplitud del transitorio de Ca²⁺ provocado por la despolarización de la membrana. Además, se observó que la activación del receptor GABA_B, no modifica la



concentración de AMPc y tampoco modula la entrada de Ca^{2+} en las células cuando estas son despolarizadas. El mecanismo molecular por el cual la activación del receptor GABA_B inhibe la secreción de las células GT_{1-7} queda por ser determinado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

Gamma-aminobutyric acid (GABA) has been implicated in the regulation of reproduction, particularly in the developmental modulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion. GnRH neurons are innervated by GABA-containing processes, and the administration of GABA stimulates and inhibits GnRH secretion in vivo and in vitro. We have previously shown that GABA can exert both of these actions in sequence, by acting directly on immortalized GnRH neurons. While the stimulation is the result of a GABA(A) receptor-mediated depolarization of the plasma membrane, the mechanism involved in the delayed inhibition is the subject of the present investigation. GABA (1 nM-10 microM) decreased the intracellular concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in a dose- and time-dependent fashion. This effect was blocked by bicuculline and mimicked by muscimol but not by baclofen. To analyze the effect of GABA on cellular excitability, we used fura-2 loaded GT1-7 cells. Activation of voltage-sensitive calcium channels by high K⁺-induced depolarization (35 mM) increased [Ca²⁺]_i. GABA (10 microM) and muscimol (10 microM) reduced the amplitude of K⁺-induced [Ca²⁺]_i transients. This inhibition was blocked by forskolin (20 microM) or 8-Br-cAMP (1 mM). Altogether, these results show that GABA(A) receptors mediate a sustained inhibitory effect of GABA on GnRH neurons, and suggest the involvement of the cAMP pathway decreasing cellular excitability.

TESIS CON
FALLA DE OROGEN

INDICE

INTRODUCCION	1
Sistema Neuroendocrino: Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.....	4
Hipotálamo.....	4
Sistema portal-hipofisario.....	6
Hipófisis.....	6
Gónadas.....	9
Neuronas GnRHérgicas.....	9
Neuronas GnRHérgicas inmortalizadas.....	12
Regulación de la secreción de GnRH.....	14
Receptores GABAérgicos.....	15
Papel fisiológico del GABA en la reproducción.....	18
El efecto del GABA en neuronas GnRHérgicas <i>in vitro</i>	23
AMPC.....	24
Canales de Ca ²⁺	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
HIPOTESIS	34
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y METODOS	35
Cultivo celular.....	35
Determinación de la concentración de AMPC.....	35
Medición de la [Ca ²⁺] _i en la población de células GT1-7.....	38
Análisis de resultados.....	41
RESULTADOS	42
DISCUSION	52
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFIA	64

TESIS CON
FALLA EN EL ORIGEN

F

INTRODUCCIÓN

La reproducción es una función de vital importancia para las especies ya que hace posible su continuidad a lo largo del tiempo. Gracias a la reproducción sexual, los cambios genéticos que ocurren en los individuos son heredados a las generaciones posteriores para ser fijados en la población. La reproducción es entonces la base de la evolución biológica.

En los mamíferos la reproducción está influida por factores provenientes del ambiente externo que son integrados en el sistema nervioso central, lo que permite la coordinación de la actividad reproductora con condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo de las crías. Los factores ambientales que afectan la reproducción son entre otros: la duración del fotoperíodo, la temperatura, la disponibilidad de alimento y la receptividad del sexo opuesto. Además existen factores internos como el metabolismo, la cantidad de grasa y las emociones, que también tienen una influencia determinante sobre la reproducción (Fink, 1988).

En el control de la reproducción intervienen una gran cantidad de factores endocrinos, los cuales establecen complejas redes de comunicación entre sí. Sin embargo, el control central de la función reproductora reside en ciertos núcleos de la base del cerebro, en la hipófisis y en las gónadas, por lo que se habla de un eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Además, existen asas de retroalimentación positiva y negativa de hormonas a todos los niveles que informan al sistema el grado de funcionamiento del mismo (ver figura 1).

En las últimas tres décadas, el conocimiento del control neuroendocrino de la función gonadal ha avanzado significativamente. Actualmente sabemos que la proteína que controla al eje reproductor es la hormona liberadora de gonadotropinas, también conocida como GnRH. Esta hormona es fundamental en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, ejemplo de ello es el

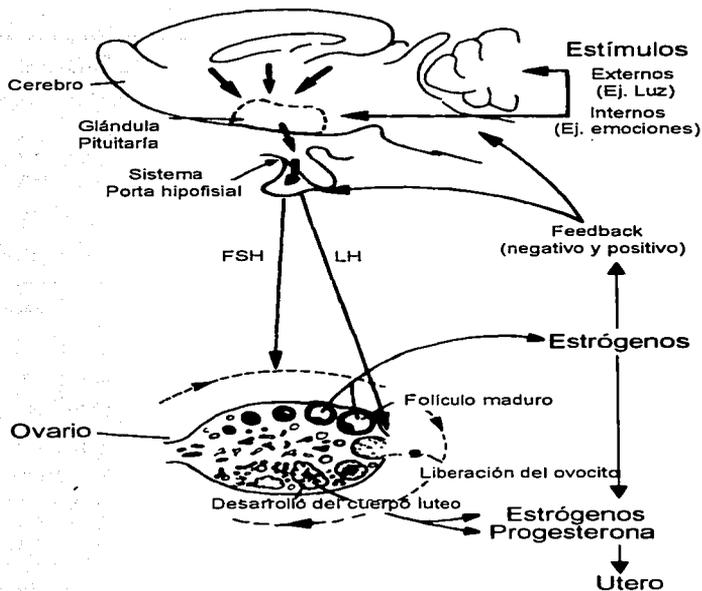


Figura 1. Diagrama que esquematiza el control del ciclo ovárico por la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante, (LH) ambas son secretadas por la glándula pituitaria. La secreción de estas hormonas es modulada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), deca péptido secretado por neuronas hipotalámicas hacia el sistema portal hipofisial. La secreción de la GnRH está influida por factores internos y externos, los cuales son procesados por el cerebro. Este sistema está regulado por asas de retroalimentación positiva y negativa. En el control de estas asas de retroalimentación se encuentran involucrados los estrógenos y la progesterona, los cuales son secretados por el ovario. Los estrógenos y la progesterona actúan sobre el útero preparando al endometrio para la implantación del cigoto (Tomado de Fink, 1988).

hecho de que una mutación del gen que codifica para la GnRH impide el funcionamiento gonadal, el cual puede ser restaurado por el trasplante de tejido fetal, terapia génica o la implantación de cápsulas liberadoras de análogos de la GnRH (Gibson et al., 1991; Mason et al., 1986; Sheffield et al., 1989). A pesar del conocimiento acumulado hasta ahora sobre la GnRH, el control que ejercen los distintos neurotransmisores sobre la secreción de este péptido es difícil de abordar experimentalmente, ya que la población de neuronas GnRHérgicas de los mamíferos es escasa (entre 1000 y 3000 células), además de que éstas se encuentran anatómicamente dispersas, por lo cual el acceso experimental es limitado. El desarrollo de nuevas técnicas de manipulación genética en la década pasada hizo posible inmortalizar y aislar neuronas hipotálamicas sintetizadoras de GnRH derivadas de un ratón transgénico (Mellon et al., 1990). Estas células conocidas como GT han mostrado ser una importante herramienta para entender el control que ejercen los diferentes neurotransmisores sobre la secreción de la GnRH.

La presente tesis es una contribución al entendimiento del efecto que ejerce el neurotransmisor inhibitorio más importante del SNC, el ácido γ amino butírico (GABA), sobre las neuronas hipotálamicas inmortalizadas secretoras de GnRH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sistema neuroendocrino: eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

Hipotálamo

El hipotálamo abarca la región del quiasma óptico hasta el borde caudal de los cuerpos mamilares. En dirección rostral, pasa sin demarcación nítida hacia el área olfatoria basal. La región que está situada inmediatamente por delante del quiasma y se extiende hasta la lámina terminal se denomina área preóptica. En dirección caudal el hipotálamo se fusiona con la sustancia gris del mesencéfalo (ver figura 2). Toda la región hipotálamica está ocupada por una matriz difusa de células, en la cual se encuentran masas nucleares más o menos diferenciadas. La región preóptica constituye la sustancia gris periventricular de la parte más rostral del tercer ventrículo. El núcleo preóptico periventricular circunda las paredes del tercer ventrículo en la región del retroceso preóptico (Carpenter, 1998). El núcleo preóptico medial, compuesto por células predominantemente pequeñas se encuentra en situación lateral al núcleo preóptico periventricular y se extiende en dirección ventral hacia el quiasma óptico. El núcleo preóptico lateral, se encuentra rostral en relación con el área hipotálamica y está compuesto por células de tamaño mediano dispersas (Iversen et al., 2000). El hipotálamo tiene conexiones extensas y complejas. Algunas fibras están organizadas en haces definidos y notorios, en tanto que otros son difusos y difíciles de localizar.

Conexiones aferentes

Las conexiones aferentes del hipotálamo que se han identificado son: 1) el fascículo prosencefálico medial, el cual es un grupo complejo de fibras que son originadas en las regiones basales olfatorias, núcleos septales, región amigdalina, sustancia inominata y complejo amigdalino. 2) Las fibras hipocampo-hipotálamicas que provienen del núcleo septal y de los núcleos mamilares medial y lateral. 3) Las aferentes reticulares del tronco encefálico, que ascienden al hipotálamo a través del pedúnculo mamilar y del fascículo longitudinal dorsal. 4) Las fibras retinohipotalámicas que se originan en las células ganglionares y proyectan de manera bilateral al núcleo supraquiasmático y al área preóptica.

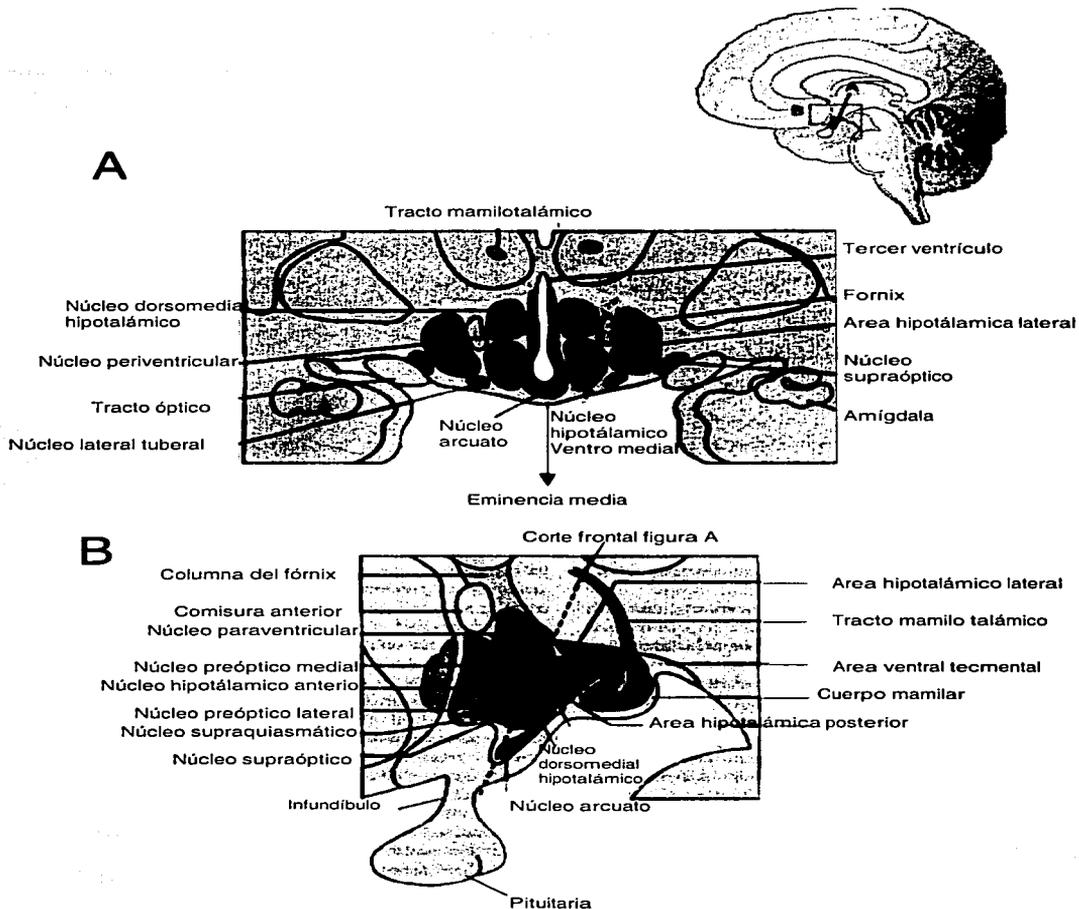


Figura 2. A) Corte transversal de cerebro humano donde se muestran las principales estructuras que conforman el hipotálamo. B) Corte sagital del hipotálamo que muestra las tres regiones en las que se divide el hipotálamo para su estudio, en orden rostro caudal aparecen: el área preóptica, el hipotálamo medial y el hipotálamo posterior. (Tomado de Iversen 2000).

Conexiones eferentes

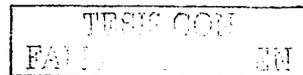
Las conexiones eferentes del hipotálamo parecen ser parte recíproca de los sistemas aferentes. Las proyecciones hipotalámicas eferentes se dividen en cuatro categorías: 1) las fibras que salen a través del fascículo, 2) las fibras de neuronas secretoras que conducen las hormonas hacia la neurohipófisis, 3) las fibras originadas en los núcleos mamilares que se proyectan al grupo nuclear anterior del tálamo. 4) Las fibras que proyectan hacia el tronco encefálico inferior y médula espinal, las cuales actúan sobre el control de las funciones autónomas del tronco encefálico inferior (Iversen et al., 2000).

Sistema portal hipofisiario

La hipófisis está irrigada por dos grupos de arterias, ambas procedentes de la arteria carótida interna. La arteria hipofisiaria superior forma un anillo alrededor de la parte superior del tallo hipofisiario. La arteria hipofisiaria inferior forma un anillo alrededor del lóbulo posterior y emite ramas al infundíbulo interior. Ambos grupos arteriales ingresan al tallo hipofisiario y se dividen en varias sinusoides. La sangre de estas sinusoides confluye en los vasos portales hipofisiarios, los cuales pasan al lóbulo anterior de la hipófisis, región que recibe toda su irrigación sanguínea a través de estos vasos. Las evidencias anatómicas y fisiológicas indican que el hipotálamo influye sobre el lóbulo anterior mediante la liberación de las hormonas hipotalámicas que viajan a través del sistema portal hipofisiario hacia el lóbulo anterior (Carpenter, 1998).

Hipófisis

La hipófisis es un núcleo compuesto de elementos neurales y epiteliales situado sobre una estructura ósea en la base del cráneo denominada silla turca, la cual está cubierta por un pliegue circular de la duramadre, llamado tienda de la hipófisis. La hipófisis se divide en dos grandes partes: la neurohipófisis, que incluye al tallo infundibular y al proceso infundibular o lóbulo neuronal, y la adenohipófisis que es la parte glandular de la hipófisis e incluye a la *pars tuberalis*, la *pars intermedia* y la *pars distalis*.



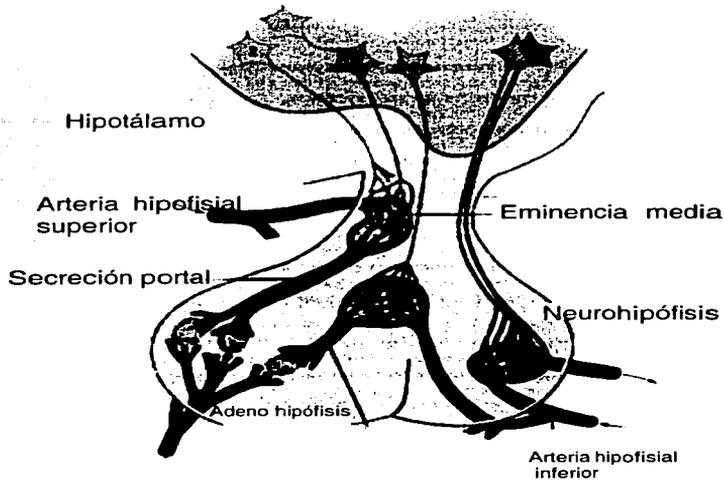


Figura 3. Varios grupos neuronales del hipotálamo participan en el control de la pituitaria. (5) Representa las neuronas peptidérgicas que sintetizan y liberan oxitocina y vasopresina a la circulación general. (3,4) son neuronas que secretan hormonas a la circulación del plexo capilar del sistema portal hipofisario. (2) Representa las neuronas que regulan la secreción de las neuronas peptidérgicas a través de contactos axo-axónicos o axo-somáticos (1) (Tomado de Iversen, 2000).

La parte neural de la hipófisis o neurohipófisis se desarrolla a partir del piso del diencéfalo y está formada por axones que se originan de las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo, las cuales sintetizan, almacenan y secretan oxitocina, vasopresina, galanina y neuropéptido Y, entre otros. Las terminales nerviosas de la neurohipófisis liberan hormonas en los vasos sanguíneos que forman el sistema portal hipofisario e irrigan a la adenohipófisis, donde regulan la secreción de otras hormonas (ver figura 3) (Iversen et al., 2000). La porción glandular de la hipófisis o adenohipófisis proviene embriológicamente de una evaginación del tejido ectodérmico derivado de la boca primitiva, llamada bolsa de Ratke. Contiene células epiteliales que sintetizan hormonas y las secretan en los capilares cercanos. Estos capilares están unidos por adenosomas y uniones estrechas, lo cual facilita que otras hormonas provenientes del hipotálamo o de otras glándulas distantes puedan llegar a la adenohipófisis.

La adenohipófisis secreta hormonas peptídicas clásicas como la hormona estimulante de la tiroides o tirotrópina (TSH), hormona estimulante de los folículos (FSH), hormona luteinizante (LH), prolactina (PRL), hormona del crecimiento (GH), hormona adrenocorticotrófica (ACTH), hormona estimulante de los melanocitos (MSH), además de otros neuropéptidos y mensajeros químicos. Cada hormona es sintetizada y liberada por un grupo específico de células, que se nombran según la hormona que sintetizan. A las células que sintetizan la FSH y LH se les llama gonadotropos (Carpenter, 1998).

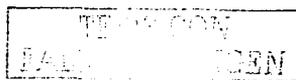
Gonadotropos

Los gonadotropos son células adenohipofisiarias que producen y secretan LH y FSH. Solo el 10% de estas células contienen LH, el otro 10% contiene FSH y el 80% restante contiene ambas hormonas.

La LH y la FSH son glucoproteínas, con un peso molecular de entre 28 y 29 kDa, formadas por dos subunidades llamadas α y β , que se encuentran unidas por enlaces no covalentes. La subunidad α es común en ambas hormonas, mientras que la subunidad β es específica de cada una de ellas. Las subunidades están glucosiladas con carbohidratos como N-galactosamina y N-acetil glucosamina. Estas modificaciones post-traduccionales, permiten a los receptores reconocer los distintos tipos de hormona (Peters, 1989).

La secreción de estas hormonas es estimulada por la GnRH, aunque aparentemente esta tiene un mayor efecto sobre la liberación de la LH que de la FSH (Clarke y Cummins, 1982). La GnRH también estimula la síntesis del RNA mensajero que codifica para las subunidades de estas dos hormonas.

Los gonadotropos presentan receptores para GnRH en sus membranas, que están acoplados a la activación de canales de Ca^{2+} , entre otras vías de segundos mensajeros. Se ha observado que después de aplicar una pequeña dosis de GnRH a los gonadotropos, estos presentan una respuesta mucho mayor a una segunda dosis, es decir, la GnRH sensibiliza a los gonadotropos (Fink, 1988).



Gónadas

La producción de los gametos, así como la secreción de los esteroides sexuales se llevan a cabo en las gónadas. Los esteroides sexuales tienen efectos sobre las gónadas regulando principalmente la gametogénesis. Además tienen una gran cantidad de efectos extragonadales, por ejemplo, coordinan los cambios en el útero, vagina y glándulas mamarias en la hembra como preparación para la cópula, fertilización e implantación, son los responsables de la aparición y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, y también modulan la conducta sexual y la libido. Los esteroides gonadales forman asas de retroalimentación tanto positivas como negativas a nivel hipotálamico e hipofisiario regulando así, directamente o indirectamente la secreción de GnRH, LH y FSH (Fink, 1988).

Las células de las gónadas tienen receptores a LH y FSH, los cuales modulan distintas funciones en estos órganos. En los machos, la FSH actúa en el testículo sobre las células de Sertoli estimulando la espermatogénesis, mientras que la LH actúa principalmente sobre las células de Leyding, estimulando la producción de testosterona y estradiol. Por otro lado, en las hembras la FSH estimula a las células de la granulosa en el ovario, induciendo el desarrollo de los folículos. La LH promueve la síntesis de estradiol, progesterona y testosterona, en las células de la granulosa, células de la teca y células lúteas. Además, la LH promueve la ovulación mediante la degradación del folículo de Graaf por medio de la activación de proteasas séricas (Fink, 1998).

Neuronas GnRHérgicas

Origen embriológico

El origen y migración de las neuronas GnRHérgicas se ha estudiado en el embrión de pollo con mayor detalle que en otras especies. En esta especie, las neuronas GnRHérgicas se diferencian a partir de la placa olfatoria (Silverman et al., 1994). La mayoría emerge del ciclo mitótico en el día 10 de gestación y comienzan a expresar el precursor de la GnRH en el día 11, aunque alcanzan la madurez bioquímica hasta después, y por lo tanto procesan el precursor hasta el



día 14 (Silverman et al., 1994, Muske, 1993). Entre los días 12 y 16 las células penetran en el cerebro ventromedial anterior y migran caudalmente para llegar a las áreas hipotalámicas septal, preóptica y anterior. Una vez allí, se intercalan con poblaciones heterogéneas de neuronas y glía. Durante su migración elaboran procesos axonales que llegan a la eminencia media en el día 14 (Silverman et al., 1994). En el día 12, el número de neuronas GnRHérgicas en el septo nasal es similar al que se observa en el cerebro adulto, lo que sugiere que esta población da lugar a todas las células GnRHérgicas del sistema nervioso central, con la posible excepción de algunas ubicadas en el cerebro medio (Schwanzel-Fukuda, 1999).

Distribución de las neuronas GnRHérgicas

La distribución de las neuronas GnRHérgicas parece tener una gran similitud entre las distintas clases de vertebrados, lo que sugiere que estos sistemas neuronales son estructuras filogenéticamente antiguas y conservadas (Muske, 1993).

Las células GnRHérgicas no están agrupadas en núcleos segregados, sino se encuentran dispersas en varias divisiones citoarquitectónicas. En la mayoría de las especies, forman un continuo difuso en forma de arco, desde la banda diagonal de Broca en el telencéfalo hasta el núcleo de la estría terminalis y otras áreas diencefálicas incluyendo el área periventricular, las áreas preópticas medial y lateral, hipotálamo anterior y la zona retroquiasmática. También incluye las zonas del núcleo supraóptico y algunas áreas dorsales de éste. Estas neuronas son escasas y su número no rebasa las dos mil células (Silverman, 1988).

Síntesis y secreción de GnRH.

La hormona liberadora de gonadotropinas fue aislada originalmente a partir de hipotálamos porcinos y ovinos. A pesar de que la GnRH activa resultó ser un decapeptido, estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos adicionales revelaron que éste es biosintetizado como parte de un precursor mayor de



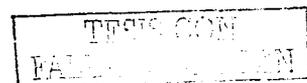
aproximadamente 10 kDa de tamaño (Gautron et al., 1981). La secuencia correspondiente a la GnRH está precedida por un péptido señal. En el segmento carboxilo terminal del precursor hay una secuencia que codifica para un péptido de 56 aminoácidos, al que se le denomina péptido asociado a GnRH (GAP) (Seeburg y Adelman, 1984). El procesamiento del precursor de GnRH incluye la separación del GAP, la ciclización enzimática de la glutamina amino terminal, y la amidación de la glicina carboxilo terminal.

En los grupos celulares del hipotálamo, se ha identificado la GnRH en vesículas granulares asociadas al aparato de Golgi. Se propuso entonces, con base en evidencia morfológica, que la GnRH es sintetizada en polisomas en el cuerpo celular, empaquetada en vesículas en el aparato de Golgi y transportada dentro de estas por el axón, para ser almacenada en la terminal axónica y ser liberada en respuesta a la estimulación apropiada (Fink, 1988).

La GnRH es liberada hacia los vasos portales hipofisarios, y llevada así a la hipófisis anterior en donde estimula la producción y secreción de la LH y FSH en los gonadotropos. La secreción de GnRH en la sangre del sistema portal hipofisario se da de forma pulsátil, con intervalos distintos en las diferentes especies estudiadas, variando entre 30 minutos y 3 horas (Levine et al., 1982). Aparentemente, la liberación pulsátil de la GnRH es necesaria para la respuesta adecuada de la hipófisis, ya que la administración continua de GnRH a células hipofisarias de rata abate la secreción de LH y FSH (Smith y Vale, 1981).

Se ha demostrado que la LH es secretada por la hipófisis también en forma pulsátil, en respuesta a los pulsos de GnRH. Por ejemplo, en la oveja, los pulsos de LH presentan una clara sincronía con los de la GnRH y las amplitudes de ambos se correlacionan adecuadamente (Clarke y Cummins, 1982). Por lo tanto, medir la secreción de LH en la sangre es un método sencillo para medir indirectamente la secreción de la GnRH.

En general se acepta que la GnRH es liberada por las terminales de la eminencia media en el espacio perivascular de los capilares fenestrados del sistema portal hipofisario a través del órgano vascularizado de la lámina terminal, que es un órgano altamente vascularizado y recibe un considerable número de



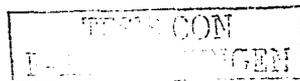
axones inmunorreactivos a GnRH del área preóptica. Además de la secreción de GnRH en el plexo proximal del sistema porta, se ha propuesto otro sistema de transporte en el que la hormona es secretada al líquido cerebro espinal periventricular y llevada a los capilares portales vía las células endoteliales en la base del tercer ventrículo (Cramer y Barraclough, 1975).

Neuronas GnRHérgicas inmortalizadas

Debido a la localización difusa y al escaso número de células GnRHérgicas, así como al gran número de factores que intervienen en su regulación, los estudios *in vivo* han resultado difíciles de realizar e interpretar. Los cultivos primarios para estudios *in vitro* tienen también la gran desventaja de ser cultivos heterogéneos, en donde intervienen muchos factores no controlables. Con el uso de estos modelos experimentales no es posible conocer si los distintos neuromediadores estudiados actúan directamente sobre las células GnRHérgicas o lo hacen a través de interneuronas que a su vez interactúan con estas. Más aún, en este tipo de estudios no se han determinado las vías de señalización intracelular que activan los diferentes moduladores para regular la secreción de GnRH ni los receptores involucrados en esta regulación.

Este problema se ha solucionado, al menos en parte por el desarrollo de líneas celulares GnRHérgicas inmortalizadas por medio de la técnica de generación de tumores genéticamente dirigida.

La técnica de tumorigénesis genéticamente dirigida consiste en la inducción de un tumor de un tipo celular determinado en algún organismo. Esto se puede lograr en ratones transgénicos, mediante la construcción de una secuencia de DNA que comprende a un oncogén ligado a la secuencia promotora de un gen que normalmente se expresa sólo en el tipo celular que se quiere transformar (por ejemplo la región reguladora activa en un tejido específico). Esta técnica se ha utilizado para inmortalizar células β -pancreáticas y gonadotropos adenohipofisarios (Hanahan, 1985; Windle et al., 1990). A finales de la década de los ochentas este mismo método fue utilizado para inmortalizar neuronas secretoras de GnRH (Mellon et al., 1990).



De esta manera, la expresión del oncogén está ligada a la expresión del gen elegido, y restringida por la activación de la secuencia reguladora escogida. Esta construcción es introducida en cigotos en la fase de una sola célula. Posteriormente, los cigotos son reimplantados en madres pseudo embarazadas, y se examinan los productos al nacer para determinar en cual de ellos existe la expresión del transgén. Los individuos que lo expresen, desarrollarán probablemente un tumor en el tejido donde se expresa la secuencia reguladora ligada al oncogén. En ese caso, el tumor es extirpado y sus células se disocian. A partir de algunas de ellas se pueden establecer líneas celulares inmortalizadas, que expresan el oncogén de manera constitutiva.

En 1990, Mellon y colaboradores utilizando esta técnica en ratones transgénicos, desarrollaron tres líneas neuronales hipotalámicas inmortalizadas, secretoras de GnRH. Para ello, se construyó un gen híbrido que contiene al promotor del gen de GnRH en la región 5', ligado al oncogen antígeno T del virus de simio 40 (SV40). Este gen híbrido se inyectó en el pronúcleo de cigotos fecundados de ratón y estos a su vez fueron transferidos al oviducto de ratonas pseudo-embarazadas. De este modo se crearon ratones transgénicos estériles, Uno de ellos desarrolló un tumor hipotalámico. El tumor fue extraído y dispersado, mostrando que sus células eran heterogéneas e incluían fenotipos neurales y gliales.

Después de 6 meses de subcultivos para separar a las células gliales de las neuronales por distintas propiedades de adherencia al substrato, se estableció una población celular pura a la que se llamó GT1, que se clonó por diluciones seriales, con lo que se logró establecer tres líneas clonales, identificadas como GT₁₋₁, GT₁₋₃ y GT₁₋₇.

Todas estas líneas expresan el RNAm de GnRH y del antígeno T y presentan un fenotipo neuronal, que incluye la extensión de neuritas y la expresión de marcadores neuronales como la enolasa neuroespecífica y proteínas de neurofilamentos de 68 kDa. Además expresan RNAm de proteínas específicas de membranas sinápticas como la VAMP-2 y la SNAP-25. Estas



líneas celulares no expresan marcadores gliales como la proteína ácida fibrilar glial o la proteína básica de mielina (Mellon et al., 1990).

Las células GT1 procesan al precursor de GnRH hacia varias formas moleculares incluyendo la GnRH biológicamente activa, y el péptido asociado a GnRH (GAP) (Weiner et al., 1992). Las líneas neuronales GT1 secretan GnRH en respuesta a la despolarización con veratridina, es decir, presentan canales rápidos de Na^+ (Mellon et al., 1990). Además, secretan GnRH espontáneamente de manera pulsátil y sincrónica, lo cual sugiere que la secreción pulsátil de GnRH es una propiedad inherente a las células GnRHérgicas, y no es provocada por otros neuromediadores (Wetsel et al., 1992; Martínez de la Escalera et al., 1992a; Krsmanovic et al., 1992). La sincronización de los pulsos de GnRH *in vitro* puede darse gracias a los contactos intercelulares que se observan entre las células GT-1 (Wetsel et al., 1992), pero se ha observado que al cultivar estas células en dos placas separadas, se dá también una sincronización entre éstas, lo que sugiere que existe un mediador químico difusible que interviene en dicha sincronización (Martínez de la Escalera et al., 1992a). Este mediador podría ser la misma GnRH, ya que las células GT-1 expresan receptores para esta hormona, y su activación produce un aumento en el Ca^{2+} intracelular así como un aumento transitorio de la secreción de GnRH, seguido de una supresión de la secreción basal (Krsmanovic et al., 1993).

El desarrollo de estas líneas neuronales inmortalizadas ha permitido el estudio directo de la biología celular y molecular de las células GnRHérgicas, así como su electrofisiología, bioquímica y la regulación que se ejerce sobre la síntesis y secreción de sus productos. En resumen, las líneas GT-1 representan un modelo experimental sumamente útil en el estudio de la neuroendocrinología de la reproducción y la comunicación neuroendocrina. Sin embargo, los resultados obtenidos con las células GT-1 deben ser interpretados con cierto cuidado, ya que son células transformadas, que podrían no reflejar completamente la naturaleza de las células GnRHérgicas *in vivo*.

Regulación de la secreción de GnRH.

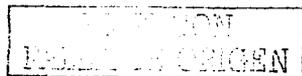
Como se ha mencionado, las células GnRHérgicas reciben una gran cantidad de estímulos provenientes del cerebro anterior, medio y posterior que regulan la secreción de GnRH al sistema porta hipofisiario. La secreción de GnRH es regulada por un gran número de neuromediadores, que incluyen neurotransmisores clásicos como las monoaminas, la histamina, aminoácidos excitadores (L-Glutamato) e inhibidores como el ácido γ aminobutírico (GABA) y una amplia lista de neuromediadores peptídicos, entre los que se encuentran los péptidos opioides, la endotelina, la hormona liberadora de tirotrófina, la sustancia P, el neuropéptido Y, e incluso la propia GnRH en un mecanismo de asa de retroalimentación ultracorta, además de otras hormonas como los esteroides gonadales (Terasawa, 1998).

Receptores GABAérgicos.

El GABA es uno de los principales neurotransmisores inhibidores en el sistema nervioso de vertebrados. El GABA activa tres diferentes clases de receptores, denominados GABA_A, GABA_B y GABA_C (Bormann, 1988; 2000).

Receptores GABA_A

El receptor GABA_A controla la inhibición rápida sináptica en el sistema nervioso central (Olsen et al., 1999). Este receptor pertenece a una superfamilia de receptores acoplados a un canal de Cl⁻, cuya apertura y cierre es controlada por la unión del neurotransmisor. El receptor GABA_A está compuesto por 5 subunidades. La combinación de las diferentes subunidades (las cuales son producto de la transcripción de genes independientes), brinda diversidad funcional al receptor GABA_A. Existen 16 diferentes tipos de subunidades identificadas hasta ahora: α (1-6), β (1-4), γ (1-3), δ (1) y ρ (1-2), lo que sugiere un número muy elevado de posibles combinaciones. Sin embargo, los estudios de ensamblaje muestran que existe una preferencia por cierto tipo de combinación de subunidades (α, β, γ) (Smith, 2001).



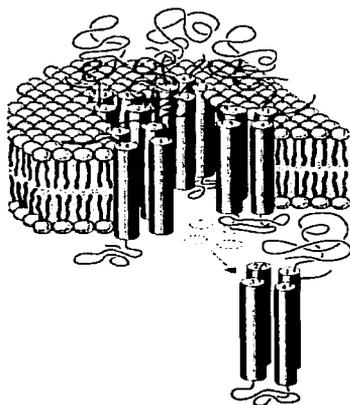
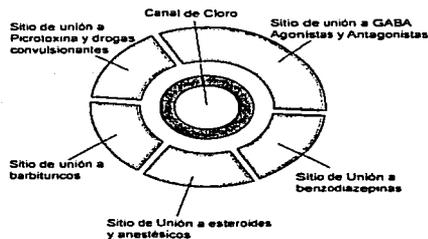
A**B**

Figura 4. A) El receptor canal GABA_A está constituido por 5 subunidades, cada subunidad contiene 4 regiones transmembranales (1-4) representadas como cilindros con estructura α hélice formado por 20 residuos de aminoácidos hidrofóbicos. Los cruces transmembranales están ligados por asas citoplasmáticas o extracelulares de residuos de aminoácidos hidrofílicos. B) Los sitios de unión se encuentran situados en porciones discretas de la parte extracelular del canal. Algunos de ellos pueden compartir la unión de más de un ligando. El receptor GABA_A también está sujeto a la modulación alósterica de algunos depresores del sistema nervioso central como las benzodiazepinas y los anticonvulsivantes.

Farmacología

La farmacología del receptor GABA_A es compleja, ya que las distintas subunidades pueden unir diferentes drogas, entre las cuales se incluyen convulsivantes, anticonvulsivantes, ansiolíticos, sedantes hipnóticos, relajantes musculares y anestésicos generales. Estos receptores son activados por GABA, isoguvacina y muscimol e inhibidos por bicuculina, gabacina (SR95531) y (+)- β -hidrastina (Bormann, 2000). El receptor GABA_A es de gran importancia ya que es el encargado del control de la excitabilidad neuronal en el sistema nervioso central (Smith, 2001).

Receptores GABA_B

Los receptores GABA_B se encuentran ampliamente distribuidos en la presinápsis y postsinápsis de las neuronas de mamíferos, modulan la transmisión sináptica suprimiendo la secreción de neurotransmisores o hiperpolarizando a células postsinápticas (Kaupmann et al., 1997). Existen al menos dos tipos de isoformas conocidas denominadas GBR1 y GBR2. Los dos isoformas están constituidas por una proteína de membrana, la cual está acoplada a una proteína G que puede inhibir la formación de AMPc y la apertura de canales de Ca²⁺, (Dolphin y Scott, 1986; Scholz y Miller, 1991; Mintz y Bean, 1993, Tatebayashi y Ogata., 1992, Obrietan y van Den Pol, 1998), activar corrientes rectificantes de K⁺ (Sodickson y Bean 1996) o modular la activación de los receptores GABA_A (Obrietan y van Den pol et al., 1998). Estudios recientes muestran que los receptores GABA_B necesitan dimerizarse para poder ejercer sus efectos fisiológicos (Kuner et al., 1999).

Farmacología

Los receptores GABA_B son activados por GABA, (-)-baclofén, ácido 4-amino-3(5-cloro-2-tienil)butanoico y 3-aminopropil(metil) ácido fosfínico (SKF 97541) y son inhibidos por faclofén, saclofén y 2-hidroxisaclofén (Bormann, 2000; Chebib y Johnston, 1999).

Receptores GABA_C

Los receptores GABA_C están constituidos por varias isoformas de la subunidad ρ formando canales de Cl⁻. Estos receptores son activados por GABA y análogos de GABA como el ácido cis-4-aminocrotonico (CACA), y el ácido trans-4-aminocrotonico (TACA), son inhibidos por el ácido acético-4-imidazo y TPNPA (Chebib y Johnston, 1999), pero son insensibles a bicuculina, barbitúricos, benzodiazepinas y baclofen. Recientemente se ha propuesto que los receptores GABA_C deben ser clasificados como un grupo especial de receptores GABA_A (Barnard et al., 1998).



Papel fisiológico del GABA en la reproducción

Los primeros estudios para tratar de relacionar la actividad GABAérgica con el control de la reproducción fueron realizados por Ondo en 1974, quien al inyectar GABA en el ventrículo lateral, observó un aumento en la concentración de LH. McCann y Rettori (1986) demostraron que el efecto estimulante del GABA podía ser bloqueado al ser coadministrado con bicuculina, un antagonista del receptor GABA_A. Estas evidencias experimentales llevaron a postular que el GABA facilitaba la secreción de LH en la adenohipófisis. Sin embargo, Donoso y Banzan (1984) refutaron esta hipótesis al observar que la inyección intraventricular de GABA o inhibidores de la enzima que lo degrada, abolía el pico preovulatorio de LH. A partir de este momento, la mayoría de los reportes que aparecen en la literatura apoyan la hipótesis de que la aplicación de GABA o sus agonistas (muscimol y baclofen) inhibe la secreción de LH (Lamberts et al., 1983; Donoso y Banzan 1984; 1986; Masotto et al., 1989; Jarry et al., 1991), mientras que la inyección intracerebral de antagonistas GABAérgicos (bicuculina y saclofén) produce un aumento en la concentración de LH (Hartman et al., 1990; Akema y Kimura 1991) e incluso un aumento en la actividad eléctrica hipotalámica (Kimura et al., 1993; Hiruma et al., 1994)

En un intento por entender de manera dinámica cómo el GABA modula la secreción de LH, el grupo de Jarry y colaboradores midieron con la técnica de "push-pull" la concentración de GABA en el área preóptica hipotalámica y determinaron de forma simultánea la concentración de LH en el suero de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas. Los resultados obtenidos indicaron que durante el periodo previo al pico de secreción de LH, la concentración de GABA disminuía significativamente en el área preóptica (Jarry et al., 1988).

A pesar de todas estas evidencias experimentales, se desconocía si el GABA ejercía sus efectos de manera directa o indirecta sobre la secreción de GnRH. El primer intento por esclarecer esta incógnita fué realizado por Nikolarakis y colaboradores (1988), quienes mostraron que al aplicar GABA a rebanadas de hipotálamo de rata, aumentaba la secreción de GnRH. El aumento podía ser mimetizado por isoguvacina (un agonista de los receptores GABA_A)

pero no por el baclofen (agonista de receptores GABA_B). Además observaron que al coadministrar tetradoxina y GABA la secreción basal de GnRH disminuía. Estos datos llevaron a sugerir que el GABA podría ejercer un efecto estimulante en el soma y un efecto inhibitor en las terminales axónicas de las neuronas GnRHérgicas. Masotto y colaboradores (1989) obtuvieron resultados similares al incubar con GABA fragmentos del área preóptica, núcleo arcuato y eminencia media de rata.

En este punto surge un nuevo interés por tratar de explicar como el GABA podía ejercer efectos tanto inhibitorios como facilitadores de la secreción de GnRH. Moguilevsky y colaboradores (1991), demostraron que el control GABAérgico de la secreción de gonadotropinas se modificaba durante la maduración sexual. Ellos observaron que la inyección de ácido amino oxiacético y muscimol es capaz de estimular la secreción de LH y FSH en ratas prepúberes, mientras que en ratas adultas, la administración de estos fármacos tiene un efecto opuesto. En este mismo estudio se observó que la aplicación de bicuculina (antagonista del receptor GABA_A) provocaba una disminución en la concentración de LH y FSH en ratas prepúberes y un aumento en ratas adultas. Asimismo, la administración de baclofen redujo la concentración de gonadotropinas tanto en ratas prepúberes como en adultas. Estas evidencias experimentales llevaron a sugerir a estos autores que el efecto de la estimulación de los receptores GABA_A dependía del estado de madurez sexual del animal, mientras que la activación del receptor GABA_B siempre tenía un efecto inhibitor tanto en animales adultos como en prepúberes.

Los distintos efectos evocados por la activación de los receptores GABA_A y GABA_B, parecían ser la respuesta a la incógnita del por qué el GABA en ocasiones estimulaba y en otras inhibía la secreción de LH. En apoyo a la idea de que los receptores GABA_B inhibían la secreción de GnRH, Akema y Kimura (1991) demostraron que la inyección intraventricular de baclofen retardaba la aparición del pico preovulatorio de LH inducido por estradiol, mientras que el 2-hidroxi saclofen (antagonista de los receptores GABA_B) aumentaba la secreción de LH de forma dependiente de la dosis. Por otra parte, Bergen y colaboradores

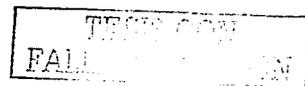
(1991) demostraron que la inyección de GABA en el área preóptica de ratas ovariectomizadas no tenía ningún efecto significativo sobre la síntesis de GnRH, sin embargo, la aplicación de baclofen disminuía la transcripción del RNAm que codifica para GnRH.

A pesar de estas evidencias experimentales, siguieron apareciendo reportes donde aún se discutía si la estimulación de los receptores GABA_A también provocaba una disminución de la secreción de LH. Ejemplo de ello son los estudios realizados por Jarry y colaboradores (1992), quienes demostraron que la inyección de GABA en el área preóptica anterior y área hipotalámica producía una marcada disminución de la concentración de LH. Sin embargo, también encontraron que la aplicación de bicuculina tenía el mismo efecto sobre la concentración de LH en el suero.

La mayoría de los trabajos que precedieron a los antes mencionados fueron intentos por encontrar la relación entre el GABA y glutamato (Donoso et al., 1992), somatostatina (Pasha y Vijayan 1992), β endorfinas (Jarry et al., 1995), noradrenalina (Adler y Crowley 1986), dopamina (Horvath et al., 1993), neuropéptido "Y" (Terasawa, 1994), opioides (Brann et al., 1992), adrenalina (Feleder et al., 1999) y citocinas del sistema inmune (Feleder et al., 1996) sobre el control de la secreción de GnRH. Es importante aclarar que la totalidad de los estudios mencionados con anterioridad, han sido realizados en ratas y ratones. A continuación se describen algunos experimentos realizados en ovejas, primates no humanos y humanos.

Ovejas

En ovejas ovariectomizadas y normales, la inyección de muscimol en el área preóptica medial, durante su época de reproducción provoca una disminución de la secreción de LH. Por el contrario la aplicación de baclofen (agonista de receptores GABA_B) no tiene ningún efecto. Los autores de este estudio sugirieron que la secreción de GnRH es regulada por neuronas GABAérgicas, que interactúan directamente con las neuronas GnRHérgicas del área preóptica medial a través de la activación del receptor GABA_A (Clarke y



Scott, 1993). Sin embargo, un estudio posterior realizado por estos mismos autores (Scott y Clarke, 1993) mostró que la estimulación del receptor GABA_B disminuía la secreción de LH en ovejas que no se encontraban en época de reproducción. Los investigadores sugirieron entonces que durante el periodo del año en el que se reproducen las ovejas, el número de receptores GABA_B disminuye siendo esta la razón por la cual no se observa ningún efecto al aplicar los agonistas del receptor GABA_B.

Por otra parte, usando técnicas de inmunocitoquímica se observó que las neuronas GnRHérgicas de las ovejas no presentan inmunorreactividad contra receptores a estrógenos. Sin embargo, las neuronas GABAérgicas que se ubican en el área preóptica son inmunopositivas; por lo que se sugirió que estas neuronas median el efecto que tienen los esteroides gonadales sobre la secreción de GnRH y por lo tanto de LH (Herbison et al., 1993).

Primates no humanos

En primates no humanos se ha sugerido que durante en el estado prepúber el sistema GnRHérgico se encuentra inhibido. Las investigaciones más recientes se han enfocado en particular al estudio de la restricción de la liberación de GnRH antes de la pubertad y el papel de GABA sobre la inhibición en el hipotálamo (Mitsushima et al., 1994).

En macacos prepúberes se ha observado que la inyección de bicuculina provoca un aumento en la secreción de GnRH. Esta manipulación farmacológica provoca el comienzo de la pubertad. En contraste, la estimulación de los receptores GABA_A, ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de GnRH en monos púberes, pero no en monos prepúberes. Asimismo, se observó que en los animales prepúberes la concentración de GABA liberada era mayor que en los animales púberes. Los autores de este estudio sugieren entonces que el GABA ejerce un efecto de inhibición tónica sobre la secreción de GnRH antes de entrar al periodo de la pubertad (Mitsushima et al., 1994). Este mismo grupo reportó posteriormente que en el hipotálamo del mono rhesus se expresaban varias isoformas de la enzima que sintetiza GABA (descarboxilasa del ácido

glutámico, o GAD). Adicionalmente, encontraron que al infundir oligonucleótidos antisentido contra estas isoformas en los prepúberes, se estimula la secreción de GnRH, especulando entonces que la expresión de las diferentes isoformas durante la madurez sexual es un factor crítico para el comienzo de la pubertad (Mitsushima et al., 1996; Kasuya et al., 1999). Sin embargo, estudios posteriores muestran que la expresión de GAD no cambia de forma significativa en monos prepúberes y adultos (Urbanski et al., 1998). El trabajo más reciente acerca de la relación que guarda el GABA con el control de la reproducción en primates fue realizado por el grupo de Teresawa. En este estudio se muestran de forma detallada los cambios en la concentración de GABA, GnRH, LH y glutamato en la eminencia media durante el periodo previo y posterior a la pubertad. Los resultados indican que los niveles de LH antes y durante la pubertad se encuentran más bajos en comparación con los observados después de esta fase. La concentración de GABA es alta antes de la pubertad y disminuye de forma significativa a mitad de este periodo. De forma paralela se observó que mientras los niveles de GABA disminuyen, los de glutamato aumentan (Terasawa et al., 1999).

Estas y otras observaciones sugieren que el sistema GnRHérgico es completamente funcional en estado juvenil, sin embargo la concentración de GnRH en esta etapa es baja en comparación con la de los adultos.

Humanos

Los primeros estudios acerca de los efectos que ejerce el GABA sobre la secreción de GnRH en humanos fueron realizados por el grupo de Elias y colaboradores (1982b). Ellos observaron que la administración de ácido valproico (inhibidor de la enzima que degrada al GABA) a hombres con deficiencia renal no producía cambio alguno en la concentración de gonadotropinas. En un estudio semejante pero realizado en mujeres sanas, se observó que el ácido valproico no provocaba cambios en la concentración de gonadotropinas, sin embargo, al ser administrado simultáneamente con GnRH produce un aumento significativo en la concentración de gonadotropinas (Elias et al., 1982a). Basándose en estos resultados, los investigadores clínicos han tratado de

relacionar los efectos del GABA con el ciclo menstrual. Por ejemplo, Melis y colaboradores (1986) mostraron que la administración del anticonvulsivo valproato de sodio durante la fase media lútea en mujeres sanas, disminuía la concentración de LH. Estudios posteriores realizados en mujeres en fase lútea normal, menopáusicas y posmenopáusicas con tratamiento de sustitución de estrógenos, mostraron que la administración del valproato disminuía la secreción de LH sólo en mujeres menopáusicas. Esto sugiere que el aumento agudo del tono GABAérgico puede inhibir la secreción de gonadotropinas cuando la concentración de estrógenos es mínima (Popovic et al., 1996). Sin embargo, Lado-Abeal y colaboradores (1996), encontraron que la aplicación regular de valproato a mujeres ovariectomizadas, no tiene efecto sobre la secreción de GnRH.

El efecto del GABA en neuronas GnRHérgicas *in vitro*

Los estudios hechos con células GT1 (Martínez de la Escalera et al., 1994; Hales et al., 1994; Sun et al., 1997 y Spergel, et al.; 1995) y neuronas embrionarias GnRHérgicas de la placa olfatoria (Kusano et al., 1995) sugieren que el GABA tiene un efecto excitador sobre la secreción de GnRH, un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y en la frecuencia de los potenciales de acción. El trabajo de Martínez de la Escalera y colaboradores (1994) examinó a corto y largo plazo el efecto del GABA sobre la secreción de la GnRH y concluyó que el GABA tiene un efecto bifásico sobre la secreción de GnRH, es decir, primero se observa una estimulación de la secreción de la GnRH, que es seguida por una inhibición prolongada. La discrepancia que existe entre los datos obtenidos *in vivo* e *in vitro* acerca del efecto del GABA sobre la secreción de GnRH podrían ser explicados por las siguientes razones:

1. El efecto del GABA podría ser distinto dependiendo del subtipo de receptor que es estimulado. Es decir, el receptor $GABA_A$ podría estar estimulando las células mientras que el receptor $GABA_B$ podría estarlas inhibiendo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. El efecto del GABA podría no estar ocurriendo directamente sobre las neuronas GnRHérgicas. Es decir, en los experimentos *in vivo* es probable que el GABA actúe sobre interneuronas que inervan a las neuronas GnRHérgicas y no directamente sobre las neuronas GnRHérgicas. En los estudios *in vitro* realizados en rebanadas de hipotálamo (Nikolarakis et al., 1988), es probable que la pérdida de terminales axónicas de otras áreas cerebrales modifique el efecto de GABA sobre la secreción de GnRH.

3. Las propiedades del receptor a GABA podrían estar cambiando durante la madurez sexual del animal. Esto podría explicar por qué la activación del receptor GABA_B en ocasiones tiene efectos sobre la secreción de GnRH y en otras no.

4. Los cambios en la homeostasis del Cl⁻ cambian la respuesta al GABA. Es decir, la hiperpolarización o despolarización de la membrana depende del potencial de equilibrio del Cl⁻, el cual a su vez es controlado por bombas iónicas como la bomba K⁺/Cl⁻, el cotransportador KCC2 (Rivera, et al., 1999; Payne, 1997) y el triple cotransportador, 2Cl⁻-Na⁺-K⁺, (Álvarez-Leffmans et al., 2001). La expresión de estas proteínas es diferente durante el desarrollo e incluso, la expresión puede variar durante el día y la noche (Wagner et al., 1997).

AMPC

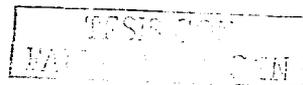
En 1958, Sutherland y Rall caracterizaron al 3,5-AMP cíclico (AMPC) como mediador celular del glucagon y la epinefrina en los hepatocitos (Sutherland y Robison, 1966), proponiendo así al AMPC como el primer "segundo mensajero". Diez años más tarde se descubrió que en esta y otras respuestas celulares mediadas por AMPC estaba involucrado un "tercer mensajero", la proteína cinasa A (PKA) (Walsh et al., 1968). Con el posterior descubrimiento de las proteínas fosfatasa, la cascada del AMPC fue la primera cascada de fosforilación y desfosforilación caracterizada (Riley et al., 1968). Los componentes de esta cascada consisten brevemente en: adenilato ciclasa, nucleótidos cíclicos, fosfodiesterasas, proteína cinasas, fosfatasa y numerosas proteínas que se activan cascada abajo y que tiene como función última alterar

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la fisiología celular. Existen otro tipo de proteínas cinasas activadas por otros segundos mensajeros como GMPc, Ca^{2+} , calmodulina y fosfolípidos. Estos mensajeros modifican las respuestas celulares a través de la modulación de proteínas cinasas y fosfatasa (Stadtman y Chock et al., 1977). Debido a que la unión covalente de los grupos fosfato en las proteínas puede ser modificada y reversible, a esta cascada de reacciones se les ha determinado como un "ciclo", en contraste con otras cascadas como la de la coagulación sanguínea, donde muchas de las modificaciones en las proteínas son irreversibles. Las cascadas cíclicas funcionan entonces como interruptores en los sistemas biológicos caracterizados por la capacidad de amplificar las señales permitiendo así que pequeños cambios en la concentración de AMPc produzcan modificaciones grandes en una variedad de proteínas como canales iónicos y enzimas. Un numeroso grupo de enzimas y metabolitos participan en las diferentes cascadas de segundos mensajeros, donde también existen múltiples sitios de modulación de la señal (Shacter et al., 1988). Las proteínas involucradas en la cascada de AMPc/PKA pueden presentar isoformas con distintas características en la distribución de los tejidos, trayendo consigo una enorme variedad de respuestas provocadas por hormonas que modifican la acumulación de AMPc en la célula.

Activación fisiológica

Varios agentes fisiológicos incluyendo las prostaglandinas, las hormonas peptídicas (por ejemplo, glucagon, somatostatina, GnRH, la hormona estimulante del folículo, la hormona luteinizante) y las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) se unen a los receptores de membrana que actúan sobre la cascada de AMPc (Livesey y Martín, 1988). Esto ocurre a través del acople entre el complejo ligando receptor y la adenilato ciclasa, interacción mediada a través de una proteína heterotrimérica (conocida también como proteína G) que inhibe o estimula la producción de AMPc. Por ejemplo, la unión de las hormonas catecolaminérgicas con los receptores adrenérgicos ($\beta 1$ o $\beta 2$) estimulan a la adenilato ciclasa a través de la proteína Gs provocando un aumento en la concentración de AMPc. Por el contrario, la interacción de las catecolaminas con



el receptor $\alpha 2$ inhibe la producción de AMPc mediante la interacción con la proteína G inhibitoria (Gi) con la adenilato ciclasa (Levitzki, 1998). Los ligandos entonces pueden estimular o inhibir la producción de AMPc dependiendo de la isoforma de proteína G y del receptor que se expresa en los distintos tipos celulares.

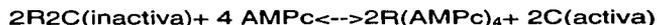
Adenilato ciclasas

La adenilato ciclasa cataliza la formación de AMPc a partir de ATP. Los miembros de esta familia de proteínas integrales de membrana tienen dos dominios transmembranales separados por una larga asa citoplasmática (Iyengar, 1993) Se piensa que tanto el asa citoplasmática como el carboxilo terminal de estas proteínas son esenciales para la función enzimática, ya que la falta de un aminoácido o interrupción de la traducción de la proteína resultan en la pérdida de la actividad enzimática, la cual puede ser recuperada con la expresión simultánea de una copia del gen sin mutar. También se sabe que la fluidez de la adenilato ciclasa en la membrana celular influye su interacción con la proteína Gs (Gordon, 1980). El cambio de la fluidez de la adenilato ciclasa en membrana celular puede ser inducido con el diterpenoide forskolina, facilitando así la interacción entre la adenilato ciclasa y la proteína Gs, dando como resultado un aumento en la producción del AMPc. Existen nueve isoformas clonadas de adenilato ciclasas reguladas por proteínas G todas ellas activadas por forskolina (Iyengar, 1993). La característica que las hace diferentes entre sí, además de la secuencia primaria, es la forma en que son reguladas. Por ejemplo, las isoformas 5 y 6 son inhibidas por la PKA y activadas por Ca^{2+} mientras que las isoformas 2 y 3 son estimuladas por Ca^{2+} (Iyengar, 1993).

Proteína cinasa dependiente de AMPc

Se conocen dos familias de proteínas cinasas dependientes de AMPc (PKA-I, PKA-II) ambas con alta afinidad a AMPc. Las dos familias de PKAs tienen mecanismos idénticos de activación. En ausencia de AMPc, las

subunidades reguladoras (R) y las subunidades catalíticas (C) forman un complejo tetramérico (2R2C). En este estado las subunidades catalíticas están inactivas porque las subunidades R funcionan como pseudosubstrato de los sitios catalíticos de C. Cuando dos moléculas de AMPc se unen a cada subunidad R, el homodímero R y la subunidad C se disocian, desbloqueando el sitio catalítico de la subunidad C (Scout, 1993).



La PKA-I y la PKA-II pueden ser activadas selectivamente y tener diferentes funciones aún en el mismo tipo celular. En células T, por ejemplo R₁ esta asociada a la membrana mientras que R₂ es citosólica, pero el ligando que activa la célula T activa R₁ pero no R₂ (Laxminarayana et al., 1993). En melanocitos la expresión de R₁ y R₂ está correlacionada con el estado de malignidad de esas células en procesos cancerígenos. Por otra lado, R₂ se encuentra unida a otras proteínas a través de una proteína de anclaje (AKAP), la cual a su vez es capaz de unirse a otras proteínas (del citoesqueleto o integrales de membrana) (Scott y McCartney, 1994). Estudios realizados en neuronas del hipocampo indican que la AKAP es requerida para modular los canales de AMPA/Kainato por PKA-II (Rosenmund et al., 1994). De esta forma las isoformas de PKA y su distribución subcelular modulan la respuesta a los cambios de concentración de AMPc en los distintos tipos celulares.

Fosfodiesterasas

Las fosfodiesterasas (PDE) hidrolizan el AMPc a AMP y el GMPc a GMP, regulando y terminando así la cascada de AMPc. Existen múltiples isoformas de PDE las cuales difieren en sus propiedades cinéticas, sustratos específicos, distribución en los tejidos y modulación por agentes fisiológicos (Houslay, 1990; Beavo, 1988). La actividad de las PDE ha sido agrupada originalmente como "de alta" y "de baja" afinidad. Las PDEs con bajos valores de Km tienen alta afinidad por el sustrato (AMPc) y son inhibidas por la presencia de GMPc (Beltman et al.,



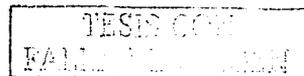
1993). Estas PDEs se encuentran en bajas concentraciones y son difíciles de purificar para su estudio. Las PDEs mejor caracterizadas son las que presentan un índice Km más alto. Estas PDEs tienen mayor afinidad por GMPc y son estimuladas por la proteína Ca²⁺/calmodulina. Las PDEs en general pueden ser moduladas por proteínas cinasas como la PKA, la CaM cinasa II y la PKG (Beltman et al., 1993). El significado fisiológico de la fosforilación de las PDEs no es claro aún, sin embargo, se ha sugerido que: a) podría ser una señal de terminación de la respuesta hormonal a través de un asa de retroalimentación negativa, b) podría fungir como sensor de los niveles celulares de AMPc, GMPc y Ca²⁺ o c) podría facilitar la secreción hormonal o de neurotransmisores vía un asa de retroalimentación positiva (Beltman et al., 1993).

Proteínas fosfatasas

Así como las PDEs actúan terminando la actividad de la PKA a través de la degradación de AMPc, las proteínas fosfatasas terminan con la función de la PKA desfosforilando las proteínas que son el sustrato de la PKA. Las fosfatasas han sido clasificadas en dos familias: la primera actúa sobre los residuos de fosfoserinas (PSer) y la segunda lo hace sobre los residuos de fosfotreoninas (PThr) (Tonks et al., 1993, Wells y Miller, 1988)

Las proteínas fosfatasas de serinas y treoninas (Ser/Thr) son las mejor caracterizadas porque son las más abundantes. Además, cerca del 99% de la fosforilación de proteínas ocurre en residuos de serina o treonina (Wells y Miller, 1988). Las Ser/Thr proteínas fosfatasas se han clasificado según su actividad, sensibilidad al calor y proteínas inhibidoras. Existen tres grupos principales los cuales han sido subdivididos en varias clases (PP1, PP2_{a,b, y c}, PP3). No existe un solo criterio bioquímico capaz de distinguir entre los distintos tipos de fosfatasas conocidos. Para poder identificar los distintos tipos de fosfatasas es necesario utilizar una combinación de toxinas (por ejemplo, el ácido okadaico, microcistina y caliculina) y sustratos específicos (Wells y Miller, 1988).

La familia de fosfatasas de tirosinas (PPTasas) está compuesta por proteínas integrales de membrana y citosólicas. Ningún ligando se ha

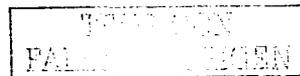


identificado para la forma de la PPTasas integrada a la membrana, pero su estructura sugiere que podría funcionar como un receptor. Existen algunas fosfatasa como la PTPH1 que contienen una secuencia homóloga a la encontrada en proteínas con la capacidad de unirse al citoesqueleto, este hecho sugiere que su localización subcelular podría ser importante. Además, las PPTasas podrían ser un punto de intercomunicación entre Ser/Thr cinasas (por ejemplo, PKC o PKA) y tirosinas cinasas, ya que la fosforilación de las serinas de la PPTasas PTP1B por PKC reduce la actividad de fosfatasa (Brautigam y Pinault, 1993, Tonks et al., 1993). Por último, las fosfatasa no desfosforilan los substratos de la PKA, pueden ser reguladas por PKA y funcionan como un asa de retroalimentación en la vía de la PKA (por ejemplo, modulando la actividad de las PDE).

Canales de Ca²⁺

Las vesículas que contienen neurotransmisores y neuropéptidos como la GnRH se encuentran asociadas a elementos del citoesqueleto de la célula en la terminal sináptica. Para que las moléculas contenidas en la vesícula se liberen, se requiere de un potencial de acción. Una vez despolarizada la membrana, se produce la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje que permite la entrada de Ca²⁺ a la célula, lo que conduce a la liberación del neurotransmisor.

En 1973, Miledi demostró que la inyección de Ca²⁺ dentro en la terminal sináptica provoca la secreción del neurotransmisor y disminuye el número de vesículas sinápticas (Miledi, 1973). Se propuso entonces que la cantidad de Ca²⁺ que entra a la terminal es proporcional a la intensidad de corriente utilizada para estimularla. Además se demostró que el Ca²⁺ entra a la terminal sináptica a través de canales dependientes de voltaje activados durante la despolarización, sugiriendo que estos canales se encuentran en la terminal sináptica (Llinas, 1992a). En el reposo, las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ son bajas (0.1 μ M). Cuando el potencial de acción despolariza la terminal presináptica, la concentración intracelular de Ca²⁺ aumenta gracias a la entrada masiva de este



ión (Llinás, 1992b). Debido al período tan corto entre la entrada de Ca^{2+} y la liberación del neurotransmisor, se ha sugerido que los canales de Ca^{2+} deben encontrarse muy cerca del sitio de liberación. La entrada de Ca^{2+} forma microdominios en los que su concentración aumenta a 100 μM durante la despolarización (Llinás, 1992c). Hasta el momento se han descrito cinco subtipos de canales de Ca^{2+} en las terminales: los tipos N, L, P (McCleskey, 1994), Q (Tareilus y Breer, 1995) y R (de Waard et al., 1996). Los dos últimos así como los P, parecen pertenecer a una subfamilia de canales cuya diferencia radica en la afinidad farmacológica que muestran por ω -toxinas (Olivera et al., 1994). El empleo de toxinas selectivas para cada uno de los subtipos de canales de Ca^{2+} produce la inhibición en la liberación de neurotransmisor y por tanto disminuye los potenciales postsinápticos dependientes del impulso nervioso (Verhage et al., 1994; Tareilus y Breer, 1995). La mayoría de las toxinas empleadas para bloquear la actividad sináptica dependiente de Ca^{2+} dejan actividad sináptica remanente (Wu y Saggau, 1995), sugiriendo que varias subclases de canales de Ca^{2+} participan durante la liberación del neurotransmisor (Reuter, 1995; Wu y Saggau 1995). En apoyo a lo anterior algunos estudios llevados a cabo en diferentes estructuras nerviosas muestran que el bloqueo combinado de diferentes toxinas permite abolir irreversiblemente la actividad sináptica (Verhage et al., 1994).

Recientemente se ha sugerido que la liberación de distintos neurotransmisores está acoplada a diferentes canales de Ca^{2+} . Así, se ha visto que en algunos casos la liberación de aminoácidos es dependiente de dihidropiridinas y ω -conotoxinas GVIA que bloquean canales de tipo L y N, respectivamente, pero es insensible a agatoxinas que bloquean canales tipo P y Q (Jackson y Usherwood 1988). Se ha demostrado que la ω -conotoxina GVIA bloquea la liberación de glutamato (Gruner y Silva 1994), acetilcolina y moduladores como noradrenalina (Boehm y Huck 1996), dopamina y serotonina, en tanto que la ω -agatoxina bloquea la liberación de GABA (Santos, 1995). Finalmente, los canales tipo L parecen participar en la liberación de neuropéptidos (Verhage et al., 1994).

TIENE CO
FALLA DE ORIGEN

Canales de Ca²⁺ tipo L y fosforilación

Los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje son los encargados de regular la entrada de Ca²⁺ a las células y están sujetos por ello a una estricta regulación. Por ejemplo, la estimulación del receptor β adrenérgico en células cardiacas provoca un aumento en la contracción del músculo cardiaco, mediante la elevación de Ca²⁺ intracelular mediada por AMPc (Reuter, 1969; Tsien et al., 1972; Reuter y Scholz 1977). A nivel molecular, los receptores β adrenérgicos están acoplados a una proteína G sensible a la toxina pertussi (Gs) que estimula a la adenilato ciclasa. Esta proteína, al ser activada, provoca un aumento en los niveles de AMPc que promueven la fosforilación de los canales de Ca²⁺ a través de la acción de una proteína cinasa dependiente de AMPc (Trautwein y Hescheler, 1990). La fosforilación del canal de Ca²⁺ tipo L provoca un aumento en el tiempo de apertura del canal durante la despolarización (Trautwein y Hescheler, 1990) que puede ser detectado a través de los registros electrofisiológicos como un aumento en el número de canales funcionales (Hess et al., 1984). Otros estudios muestran que la aplicación de AMPc aumenta la apertura de canales mediante la fosforilación de estos (Yue, et al., 1990). La información que se tiene disponible acerca de los canales de Ca²⁺ tipo L en neuronas es muy pobre en comparación con la de células cardiacas. El aumento en la corriente de los canales de Ca²⁺ por acción de noradrenalina y dopamina, se ha observado en neuronas de hipocampo (Gray y Johnston, 1987; Fisher y Johnston, 1990; Kavalali et al., 1997) y neocórtico (Surmeier et al., 1995). Además se ha visto que la subunidad $\alpha 1$ del canal de Ca²⁺ tipo L cardiaco, también es expresada en neuronas (Snutch et al., 1990). Es importante destacar que la fosforilación de este sitio, es crítica para que el canal de Ca²⁺ aumente su probabilidad de apertura (Snutch et al., 1990). Por otra parte, se sabe que la facilitación inducida por AMPc, puede ser bloqueada por inhibidores de la proteína cinasa como el H-7 o el H-89 (Artalejo et al., 1992).

Sin embargo, es importante mencionar que la aplicación de estimuladores de la adenilato ciclasa no siempre tiene un efecto positivo sobre la

apertura del canal. Esto podría deberse al equilibrio que existe entre la actividad de fosfatasas y de proteína cinasas. Es decir en algunas células las fosfatasas son muy activas por lo que los canales de Ca^{2+} se encuentran desfosforilados. Esta situación metabólica permite que la activación de proteínas cinasas provoque un aumento en la apertura de los canales, mientras que en otras células en donde no se observa ningún efecto, es probable que la actividad de fosfatasas sea menor, esto provoca que los canales de Ca^{2+} se encuentren fosforilados en estado basal y por tanto la estimulación de la adenilato ciclasa no provoque un aumento de la corriente de Ca^{2+} (Surmeier et al., 1995).

Planteamiento del problema

Los avances recientes en el desarrollo de líneas neuronales inmortalizadas han permitido generar una nueva línea de neuronas GnRHérgicas derivadas de un ratón transgénico denominadas células GT₁ (Mellon et al., 1990). Estas células expresan un oncogén de manera constitutiva y secretan de forma pulsátil GnRH, con episodios separados por intervalos de entre 22 y 30 min. semejantes a los observados en ratones castrados. Además, presentan características morfológicas (Weiner et al., 1992) y electrofisiológicas (Bosma, 1993) similares a las observadas en cultivos primarios de neuronas hipotalámicas. Estudios realizados con neuronas GT₁ muestran que el GABA induce un aumento rápido en la concentración de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) que facilita la secreción de GnRH (Hales et al., 1994; Martínez de la Escalera et al., 1994; Spergel et al., 1995; King et al., 1999). Sin embargo, también se ha demostrado que el GABA tiene un efecto bifásico sobre la secreción de GnRH, es decir, que produce una fase estimulante rápida pero transitoria, seguida por una fase de inhibición y tónica de la liberación de esta hormona (Martínez de la Escalera et al., 1994). El efecto despolarizante rápido del GABA se ha estudiado en células GT₁ y en neuronas hipotalámicas (Chen et al., 1996). Este fenómeno es atribuido a que el potencial de reposo del Cl⁻ es más positivo que el potencial de membrana en estas células. Esta condición iónica provoca que al activarse el receptor-canal GABA_A, se produzca una corriente saliente de cloro, provocando la despolarización de la membrana y la apertura de canales dependientes de voltaje.

El efecto inhibitorio del GABA sobre la secreción de GnRH no sido estudiado. Existen evidencias experimentales que sugieren la participación del receptor GABA_B como el posible mediador de esta fase (Martínez de la Escalera et al., 1994). El mecanismo por el cual este receptor participa en la fase inhibitoria aún no se ha explorado. Sabemos que la activación del receptor metabotrópico GABA_B, provoca la inhibición de la excitabilidad celular mediante uno o la combinación de los siguiente mecanismos: 1) activando una proteína

G_{Vo} la cual puede liberar su subunidad α que inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, 2) activando canales de K^+ rectificantes de voltaje (GIRK) que hiperpolarizan a la membrana, o 3) modulando la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Bowery, 1993, Bowery et al., 2002). Dados estos antecedentes, en la presente tesis se plantea la siguiente:

Hipótesis

La activación del receptor $GABA_B$ produce una disminución de la formación de AMPc en células GT_{1-7} . La inhibición en la producción de AMPc modula la entrada de Ca^{2+} en las células GT_{1-7} cuando estas son despolarizadas en presencia de GABA.

Objetivo General:

Estudiar la fase inhibitoria del GABA en células GT_{1-7} .

Objetivos específicos

- 1) Determinar si la activación del receptor $GABA_B$ modifica la concentración de AMPc en las células GT_{1-7} .
- 2) Determinar si la posible modificación en la concentración de AMPc intracelular de las células GT_{1-7} provocada por la activación del receptor $GABA_B$, afecta la entrada de Ca^{2+} en células GT_{1-7} durante la despolarización de la membrana.

Material y métodos

Cultivo celular

Las células GT₁₋₇ fueron donadas por el Dr. R.I. Weiner, de la Universidad de California (San Francisco). Las células se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/ml directamente en placas de 24 pozos o sobre cajas de cultivo de 35 mm de diámetro (Costar) conteniendo cubreobjetos de vidrio rectangulares de 9x22mm (Termanox miles, Maperville, IL) previamente, esterilizados y cubiertos con poli-L -lisina (Sigma, P5899), 0.1 mg/ml en una solución trizma (Sigma, trizma hidrociorada T1535) 0.05 M y pH 7.4. Las células se incubaron en medio DMEM (Gibco 630-5250PE) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (Gibco 26140-012), 2 mM de L-glutamina (Sigma G7513) y 10 000 unidades de penicilina estreptomina a 37°C en una incubadora con atmósfera húmeda conteniendo 95% O₂ y 5 % de CO₂. Cuando las células alcanzaron el 50% de confluencia el medio se reemplazo por medio de cultivo definido (Opti-MEM; Gibco) sin suero por dos días.

Determinación de la concentración de AMPc

Extracción de AMPc

La extracción de AMPc se realizó de la siguiente forma: una monocapa de células GT₁₋₇ se incubó en medio OPTIMEM suplementado con 1 mM de IBMX durante 90 min. Posteriormente, las células se incubaron con distintas concentraciones de las drogas GABAérgicas (GABA, muscimol, baclofén, bicucullina) durante 1 a 30 min. Al término de la incubación, la monocapa de células se lavó con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) en ausencia de Ca²⁺ y Mg²⁺. De la suspensión celular obtenida se determinó el número de células por ml con ayuda de un hemocitómetro y azul de tripano. Posteriormente, las células se lisaron añadiendo 1 ml de HCl 0.1N a 4 °C y se congelaron a -20 °C durante una noche. Al siguiente día el lisado se sonicó con un Polytron



(Brinman instruments). La muestra se centrifugó (10,000 g por 30 min.) y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta el día del radioinmunoensayo.

Acetilación de la muestra.

Con la finalidad de aumentar la sensibilidad del radioinmunoensayo para la detección de AMPc, las muestras se acetilaron. Primero se diluyó la muestra en una proporción 1:25 con la solución amortiguadora del ensayo (ver apéndice A). La solución de acetilación se preparó mezclando 1 ml de ácido acético anhídrido con 2 ml de trietilamina en un tubo de ensayo de cristal 12X75 mm (Fisher 14-961-28). Esta solución es muy inestable por lo que se preparó fresca para cada experimento realizado. Posteriormente se mezclaron 20 μl de la dilución de la muestra (1:25) y 480 μl de solución amortiguadora de ensayo en un tubo de cristal para cada muestra. En otra serie de tubos se añadieron 500 μl de soluciones estándares, las cuales contenían concentraciones conocidas de AMPc (0.05, 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15, 30, 50 pmol/ml) con la que se construyó la curva de calibración del ensayo. Por último, se añadieron 25 μl de la solución de acetilación a todos los tubos y se mezclaron con ayuda de un vortex por 5 segundos. La reacción de acetilación se realizó a temperatura ambiente.

Radioinmunoensayo (RIA)

Para realizar el inmunoensayo se colocaron 100 μl de las muestras y las soluciones estándares acetiladas se pipetearon en una nueva serie de tubos de cristal. En otra serie de tubos se pipetearon 100 μl de solución amortiguadora acetilada, con la finalidad de calcular la unión inespecífica de la muestra (NSB) y el estándar 0 (Bo). Posteriormente se añadieron 100 μl de AMPc marcado con yodo radioactivo (^{125}I -AMPc) en todos los tubos, incluidos los tubos para medir la radioactividad total y se añadieron 200 μl de anticuerpo anti-AMPc policlonal AB505 (Chemicon, Temecula, CA) a todos los tubos, excepto a los de actividad total y a los etiquetados como de unión inespecífica. El contenido de cada tubo se mezcló por 5 segundos con ayuda de un vortex y se dejaron incubar por 24 hrs. a 4°C . Después se procedió a precipitar el complejo antígeno-anticuerpo



añadiendo 1 ml de solución de precipitación a 4 °C (ver apéndice), a todos los tubos, (excepto a los etiquetados como de actividad total) y se centrifugaron a 2000 g por 30 min. El sobrenadante se decantó en todos los tubos, excepto en los utilizados para cuantificar la radioactividad total. Por último, la radioactividad se midió en un contador de radioactividad durante un minuto por cada muestra.

Cálculo de la concentración final de AMPc

La construcción de la curva estándar para determinar la concentración de AMPc se hizo de la siguiente forma. Primero se calculó el porcentaje de unión específica para cada muestra leída en el contador aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\%B/B_0 = (CM) / (B_0) \times 100$$

$$\%B/CT = (CM) / (CT) \times 100$$

en donde, CM corresponde a las cuentas de la muestra, CT a las cuentas totales de la radioactividad utilizada y B₀ a las cuentas en el estándar 0. Después de calcular el porcentaje de radioactividad unida para las muestras y el estándar 0, así como de determinar la cantidad de radioactividad unida inespecíficamente (NSB), se construyó un gráfico semilogarítmico con los datos obtenidos del %B/B₀ y las concentraciones de AMPc de los estándares (ver figura 5)

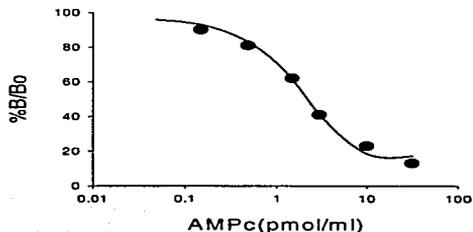


Figura 5. El gráfico muestra una curva típica de calibración del ensayo de AMPc, utilizada para determinar la concentración de este segundo mensajero presente en los extractos celulares de las neuronas GT₁₋₇.

Para calcular la concentración de AMPc en la muestra se tomó en cuenta el factor de dilución, es decir que los valores de AMPc obtenidos de la



interpolación de %B/Bo en la gráfica semilogarítmica, se multiplicaron por 25 para tener la concentración de AMPc en pmol/ml.

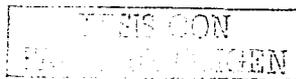
Medición de la $[Ca^{+2}]_i$ en la población de células GT₁₋₇.

Cargado de las células con Fura-2

Antes de cada experimento una solución 6.2 mM de fura-2 AM (Molecular Probes) se preparó de la siguiente forma: 50 ng de fura-2 AM se diluyeron en 4 μ l de dimetilsulfóxido anhídrido (DMSO, Sigma) y 4 μ l de ácido plurónico (Sigma). De esta solución se tomaron 4 μ l y diluyeron en un volumen final de 5 ml de solución ringer normal (140 mM de NaCl, 2.8 mM KCl, 2.0 mM de $MgCl_2$, 1 mM de $CaCl_2$, 10 mM de HEPES y 10 mM de glucosa pH 7.3), obteniendo una concentración final de fura-2 AM de 5 μ M. La solución se agitó vigorosamente antes de ser utilizada. Posteriormente, los cubreobjetos con las células se lavaron con ringer normal y después se incubaron con la solución de fura-2 AM antes descrita durante 40 min. Por último, se lavaron 3 veces con solución ringer y se dejaron reposar por 20 min adicionales para permitir la desesterificación del fura-2 dentro de las células.

Medición de la intensidad de fluorescencia en las células

Una vez cargadas las células, el cubreobjetos se colocó en una cubeta de cuarzo con ayuda de un sujetador plástico (ver figura 6). El plano del cubreobjetos fué de 45° con la finalidad de minimizar la luz reflejada hacia el fotomultiplicador. Las células se perfundieron continuamente con solución ringer normal, solución ringer 35 mM de K^+ , solución ringer conteniendo GABA, picrotoxina, muscimol, forskolina, H89 u 8-Br AMPc. Todos los registros de fluorescencia se realizaron a 37°C con un espectrofluorómetro (SLM-Amico Rochester, NY) equipado con una lámpara de 150 W de xenón, un sistema de calentamiento de la muestra y sistema de perfusión.



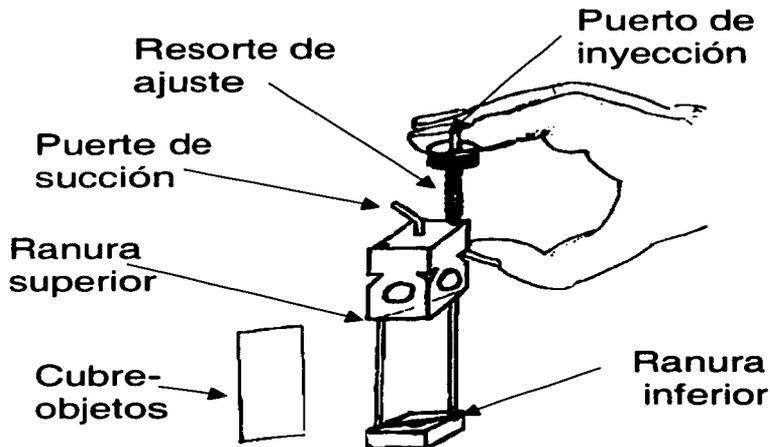


Figura 6. Esquema del dispositivo de colocación del cubreobjetos. Una vez que las células se cultivaron en el cubreobjetos y se cargaron con $5 \mu\text{M}$ de Fura-2, este se colocó en el dispositivo se sujeción, deslizando a través de las ranuras superior e inferior del dispositivo. Posteriormente, el dispositivo se insertó en una cubeta de cuarzo y se colocó en el espectrofluorómetro. Por último, los puertos de inyección y de succión se conectados al sistema de perfusión.

Los cubreobjetos con células se expusieron alternadamente a un rayo de luz de 340 nm y 380 nm . La luz emitida por la muestra se colectó a 510 nm , digitalizó y analizó con ayuda del software del equipo.

Cálculo de la $[\text{Ca}^{+2}]_i$

Para calcular la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ se utilizó la siguiente fórmula:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)}$$

en donde, K_d es la constante de disociación del fura-2 a 37°C , $\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R}$ es igual al: $I_{380, \text{cero}} / I_{380, \text{max}}$, siendo, $I_{380, \text{cero}}$ e $I_{380, \text{max}}$ es la intensidad de la fluorescencia emitida por el fura-2 a 510 nm , cuando éste es excitado con un rayo de luz a 380

nm en una solución ausente de Ca^{2+} y en una solución saturada Ca^{2+} respectivamente. R es igual a $(I_{340}-B_{340}) / (I_{380}-B_{380})$, en donde, I es la intensidad de la fluorescencia emitida a 510 nm, cuando las células son expuestas a un rayo de luz de 340 nm y 380 nm respectivamente durante el experimento, B_{340} y B_{380} representan la fluorescencia de fondo (ruido) emitida a 510 nm por el cubreobjetos cuando éste es excitado con un rayo de luz a 340 y 380 nm respectivamente. Mientras que R_{\min} es igual a: $(I_{340,\text{cero}}-B_{340})/(I_{380,\text{cero}}-B_{380})$ y R_{\max} es igual a $(I_{340,\text{max}}-B_{340})/(I_{380,\text{max}}-B_{380})$. Nuevamente cero y max se refieren a la intensidad de fluorescencia emitida a 510 nm por el fura-2 en una solución sin de Ca^{2+} y en una solución saturada de Ca^{2+} respectivamente.

Cálculo de la Kd del fura-2

Para determinar la constante de disociación (Kd) del fura-2 a 37°C, en una solución a pH 7.2, se utilizó el kit de soluciones amortiguadoras de la compañía Molecular Probes (C-3008), el cual contenía una solución 10 mM de etilenglicol-bis(b-aminoetil eter)-N,N,N',N'-ácido tetracético (EGTA) y una solución 10 mM CaEGTA, a las cuales se añadió 25 μM de fura-2 (Molecular Probes). Las soluciones estándar se prepararon con diferentes concentraciones de Ca^{2+} . Ambas soluciones contenían 100 mM de KCl, 1 mM de Mg^{2+} libre y 10 mM de ácido 3-(N-morfolino) propansulfónico con un pH 7.2. El Mg^{2+} y el K^{+} fueron incluidos para mimetizar la composición iónica del ambiente intracelular. La solución estándar saturada con Ca^{2+} se hizo añadiendo CaCl_2 a la solución de CaEGTA hasta que la intensidad de fluorescencia a 380 nm no disminuyera más. El promedio de la intensidad de fluorescencia para cada solución estándar de Ca^{2+} fué determinado con el programa analizador del espectrofluorómetro. Los valores de la intensidad de fluorescencia se graficaron con el programa Sigma Plot (Jandel Scientific, San Raphael, CA) de la siguiente manera: la concentración de Ca^{2+} libre en el eje "X" contra el logaritmo de $[(R-R_{\min})/(R_{\max}-R)]$ en el eje "Y". Entonces se tomó el valor de intersección en el eje de las "X" (punto que según este método representa el logaritmo de la Kd expresada en moles por litro). El inverso del logaritmo de este número en nuestras condiciones



experimentales fue de 175.8 nM. Ninguna proteína fue añadida para semejar el factor de viscosidad del citosol.

Determinación de la R_{max} y R_{min} in vivo.

Las constantes R_{max} y R_{min} se determinaron de la siguiente manera para cada cubreobjetos conteniendo células: al finalizar el experimento las células se perfundieron con 5 μ M de ionomicina en presencia de 1 mM de Ca^{2+} para obtener el valor de R_{max} extracelular y 20 mM de EGTA para obtener el valor de R_{min} .

Análisis de resultados

Las diferencias significativas se probaron utilizando el análisis de varianza de una vía, seguida por la técnica de comparación múltiple de Fisher con un nivel de significancia de 0.05.

La constante de inhibición (K_i) para la bicuculina se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$K_i = IC_{50} / (1 + ([L] / K_{d_{GABA}}))$$

donde la IC_{50} es la concentración necesaria de bicuculina para bloquear el 50% del efecto inhibitorio del GABA sobre la formación de AMPc.; $[L]$ corresponde a la concentración de agonista, en este caso GABA, en la que se realizó el experimento y K_d se refiere a la constante de afinidad del GABA en el sistema, en este caso se utilizó el valor de EC_{50} del GABA para este calculo, El valor de EC_{50} se refiere a la concentración de GABA requerido para inhibir el 50% de la acumulación de AMPc. El valor de pK_i fue calculado aplicando la siguiente ecuación:

$$pK_i = -\log [K_i]$$

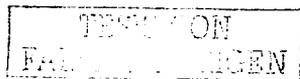
donde, K_i se refiere a la constante de inhibición y \log se refiere a la función logarítmica.

TEXTO CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados

El GABA inhibe la acumulación de AMPc en células GT₁₋₇.

Para determinar si el GABA regula la formación de AMPc en neuronas GnRHérgicas, se utilizó la línea celular inmortalizada de ratón GT₁₋₇ como modelo. Las células GT₁₋₇ se incubaron en presencia de 1 mM de isobutilmetilxantina (IBMX), un inhibidor de amplio espectro de las fosfodiesterasas que degradan al AMPc. El uso de IBMX tiene las siguientes ventajas: 1) permite la acumulación de AMPc intracelular y facilita su detección y 2) permite distinguir el efecto directo del GABA sobre la acumulación de AMPc y no sobre la posible estimulación de la degradación del mismo. Para determinar el tiempo requerido de incubación con IBMX para alcanzar la acumulación estable de AMPc en las células, se realizó un seguimiento temporal de la acumulación de AMPc en presencia de IBMX. En nuestras condiciones experimentales se necesitaron 90 minutos para alcanzar la acumulación estable de AMPc. La incubación por 90 minutos con IBMX provocó un aumento en la acumulación de AMPc (13.2 ± 1.8 pmol/ 10^5 células) en comparación con las células no tratadas (4.5 ± 0.3 pmol/ 10^5 células). Una vez determinado el tiempo en el cual se estabiliza la acumulación de AMPc en presencia de IBMX, las células GT₁₋₇ se incubaron por 90 minutos con 1 mM de IBMX y posteriormente se añadieron al mismo medio de cultivo dosis crecientes de GABA (1nM, 100 nM, 1 μ M y 10 μ M) por 30 minutos. En la figura 7A se muestra la curva dosis respuesta a GABA de la acumulación de AMPc en presencia de 1 mM de IBMX. Los datos obtenidos muestran como el tratamiento con GABA inhibe la acumulación de AMPc de forma significativa en las concentraciones de 100 nM, 1 μ M y 10 μ M. Cada punto en el gráfico refleja el promedio de 6 determinaciones independientes de la concentración de AMPc. Con la finalidad de conocer la dinámica temporal del efecto de GABA sobre la acumulación del AMPc, se determinó la concentración de este segundo mensajero a lo largo de 30 minutos de exposición a una dosis única de GABA (10 μ M). En la figura 7B se muestra que los niveles de AMPc disminuyeron rápidamente alcanzando una



concentración de AMPc similar a la observada en las células no incubadas con IBMX en tan sólo dos minutos. El nivel mínimo sostenido de acumulación de AMPc se alcanzó a los 10 min de tratamiento con GABA.

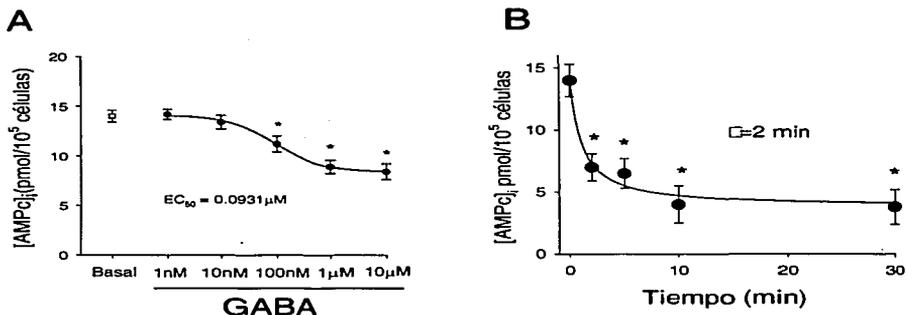


Figura 7. Efecto del GABA sobre la acumulación de AMPc en células GT_{1.7}. A) El gráfico muestra como el GABA inhibe la formación de AMPc de forma dependiente de la dosis en células GT_{1.7}. El símbolo (□) corresponde a la acumulación de AMPc en células preincubadas con IBMX (1mM) durante 120 min. (Basal). Los símbolos (●) corresponden a las determinaciones de AMPc en células preincubadas con IBMX durante 90 min. y estimuladas con diferentes concentraciones de GABA (1nM-10µM) durante 30 min. en presencia de IBMX. Los puntos representan la media ± el error estándar de 6 ensayos independientes. *p<0.05 vs Basal. B) Curso temporal de la inhibición de AMPc en células GT_{1.7} en presencia de GABA. La figura muestra la inhibición en la acumulación de AMPc en células GT_{1.7} preincubadas con IBMX (1mM) durante 90 min. y estimuladas con GABA (10 µM) e IBMX. Cada punto representa la media ± el error estándar de 6 ensayos independientes. *p<0.05 vs Basal. El valor de □ es el tiempo que requiere el GABA (10 µM) para ejercer el 50% de su efecto sobre la acumulación de AMPc.

Para discernir la naturaleza de los receptores GABAérgicos que median este efecto inhibitorio sobre la formación del AMPc, se incubaron células GT_{1.7} con muscimol o baclofén, agonistas de los receptores GABA_A y GABA_B respectivamente. La incubación con dosis crecientes de muscimol (100 nM, 1 µM y 10 µM) por 30 minutos inhibió la concentración de AMPc de las células de forma similar a la observada en células incubadas con GABA (figura 8B). Por el contrario, las células tratadas con dosis crecientes de baclofén (100 nM, 1 µM y 10 µM) por 30 minutos no mostraron cambios significativos en los niveles de

AMPC (figura 8A). Para corroborar la mediación de receptores GABA_A en el efecto inhibitorio de la formación de AMPC, las células GT₁₋₇ fueron incubadas con una dosis efectiva de GABA (10 μM) en presencia de dosis crecientes (100 nM, 1 μM y 10 μM) de bicuculina (un antagonista no competitivo de receptores GABA_A). Los datos muestran que la bicuculina inhibe de manera dependiente de la dosis el efecto inhibitorio del GABA sobre la formación de AMPC (figura 8C).

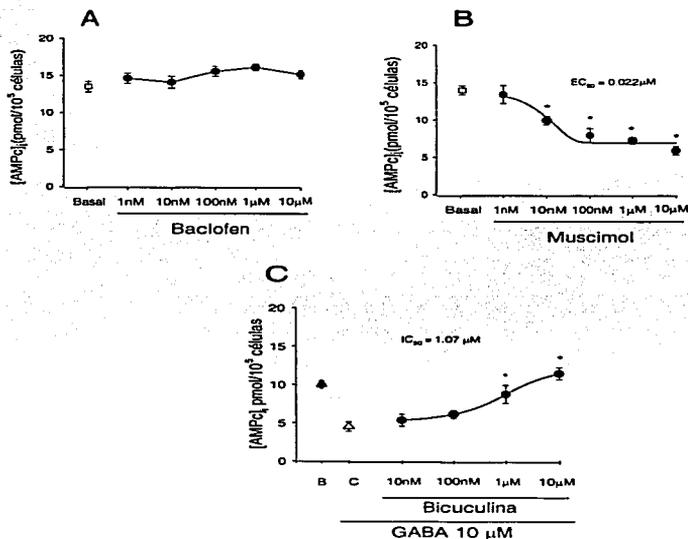


Figura 8. Efecto del muscimol, baclofén y GABA solo o en combinación con bicuculina, sobre la acumulación de AMPC en las células GT₁₋₇ preincubadas por 90 min. en presencia de 1 mM IBMX. A) Las células GT₁₋₇ fueron estimuladas por 30 minutos con dosis crecientes de baclofén (agonista del receptor GABA_B). B) Las células GT₁₋₇ fueron estimuladas por 30 minutos con dosis crecientes de muscimol (agonista del receptor GABA_A). La EC₅₀ es la concentración de muscimol en la cual se tiene el 50% del efecto sobre la acumulación de AMPC. En C) se muestra el efecto de la incubación de las células con GABA (10 μM) solo o en combinación con concentraciones crecientes de bicuculina (antagonista competitivo del receptor GABA_A). La letra (B) se refiere a la concentración de AMPC en células incubadas con 1 mM de IBMX por 120 min. y (C) al grupo control, es decir, células preincubadas con 1 mM IBMX y 10 μM de GABA en ausencia de bicuculina. La IC₅₀ se refiere a la concentración de bicuculina requerida para inhibir el 50% del efecto que tiene el GABA sobre el bloqueo de la acumulación de AMPC. En todos los casos cada punto representa la media ± el error estándar de seis experimentos independientes. *p<0.05 vs la concentración de AMPC antes de la administración de bicuculina.

El GABA inhibe el transitorio de Ca^{2+}_i inducido por K^+

En un estudio previo realizado por nuestro grupo se observó que el GABA tiene un efecto bifásico sobre la secreción de GnRH. Es decir el GABA promueve la secreción de GnRH en una primera fase pero inhibe la secreción pulsátil de GnRH en una segunda (Martínez de la Escalera et al. 1994). Con la finalidad de estudiar si el receptor $GABA_B$ podría estar modulando la entrada de Ca^{2+} , la cual está asociada a la secreción de la GnRH (Martínez de la Escalera et al. 1992), en el presente estudio se cuantificó la entrada de Ca^{2+} en las células GT1 inducida por una solución despolarizante de K^+ , en presencia de agonistas y antagonistas GABAérgicos, así como en presencia de forskolina (estimulador de la adenilato ciclasa) y 8-br AMPc (análogo permeable del AMPc).

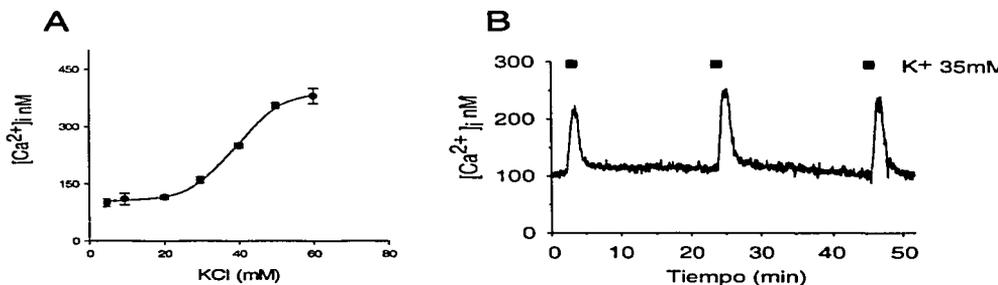


Figura 9. Transitorio de Ca^{2+} provocado por la despolarización inducida por potasio (K^+) en neuronas GT_{1-7} . La $[Ca^{2+}]_i$ se determinó a partir de una población de células GT_{1-7} pegadas a un cubreobjetos y preincubadas por 1 hr. con $5 \mu M$ de Fura-2. La $[Ca^{2+}]_i$ se cuantificó con la ayuda de un espectrofluorómetro. A) La gráfica muestra el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ durante la despolarización durante 2 min. de las neuronas GT_{1-7} por el aumento del K^+ extracelular. Cada punto representa la media \pm el error estándar de cuatro experimentos independientes. Los asteriscos indican los puntos que son significativamente diferentes ($p < 0.01$) comparados con los niveles normales de la $[Ca^{2+}]_i$. B) En esta gráfica se muestra como la perfusión de K^+ 35 mM (barras negras) por 120 seg. provocó un aumento rápido de la $[Ca^{2+}]_i$, la cual puede ser repetida sin que se observen variaciones significativas de la amplitud del transitorio.

En nuestras condiciones experimentales, las neuronas GT_{1-7} mostraron una $[Ca^{2+}]_i$ estable (108 ± 10.3 nM, $n=45$) en solución Ringer. La perfusión de una

solución despolarizante de K^+ por 2 minutos resultó en un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ dependiente de la concentración de K^+ (Figura 9A). Además, la estimulación consecutiva con una solución despolarizante de K^+ 35 mM durante 120 segundos separadas por intervalos de 20 minutos, generó transitorios de Ca^{2+}_i con una amplitud promedio de 210 ± 23 nM los cuales no son estadísticamente diferentes entre ellos ($n=10$) (Figura 9B).

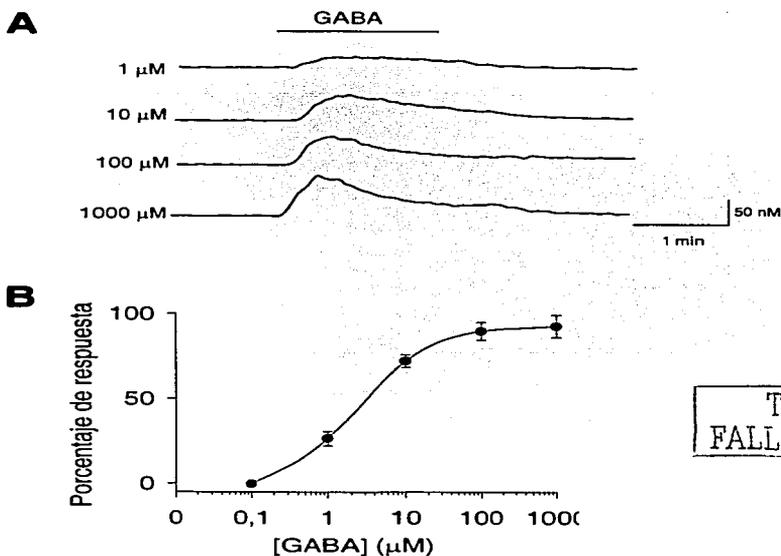


Figura 10. Curva dosis respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por GABA en células GT_{1-7} . A) Los trazos muestran el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ provocado por 1, 10, 100, y 1000 μ M de GABA en neuronas GT_{1-7} preincubadas con 5 μ M de fura-2. B) Curva dosis respuesta de los transitorios de Ca^{2+}_i provocados por GABA. Los puntos representan el promedio de siete experimentos independientes. El pico máximo del transitorio de Ca^{2+}_i provocado por 1000 μ M de GABA fué normalizado al 100 %. La curva se construyó utilizando la siguiente ecuación logarítmica, $Y = E_{max} / [1 + (EC_{50} / C)^n]$ en la cual C representa la concentración de GABA, El valor de EC_{50} fué de 4.5 μ M. El coeficiente de Hill (n) calculado fué de 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otra parte, la aplicación de GABA por 120 segundos resultó en un aumento de la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i , de forma dependiente de la dosis, como se ilustra en la figura 10A. En ninguno de estos experimentos se observó un aumento significativo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al aplicar $0.1 \mu\text{M}$ de GABA. En cambio, en todos los experimentos observamos un aumento rápido y progresivo de la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i en respuesta a $1, 10, 100$ y $1000 \mu\text{M}$ de GABA. La concentración en la cual el GABA induce el 50% de la respuesta máxima (EC_{50}) fue de $4.5 \mu\text{M}$ (Figura 10B).

Para probar la hipótesis de que la exposición crónica a GABA afecta la entrada de Ca^{2+} en las neuronas GT_{1-7} , se midió la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i provocado por la solución despolarizante de K^+ en presencia de GABA. En la figura 11A se muestra como la perfusión continua con GABA $10 \mu\text{M}$ por 30 minutos induce un transitorio rápido de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con una amplitud al pico de $150 \pm 15 \text{ nM}$ y un regreso a la concentración basal entre 5 y 8 minutos después de iniciada la aplicación de GABA. La administración de la solución despolarizante de K^+ , después de quitar el GABA del medio provocó un transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, similar en amplitud al observado antes de la administración de GABA (Figura 11A).

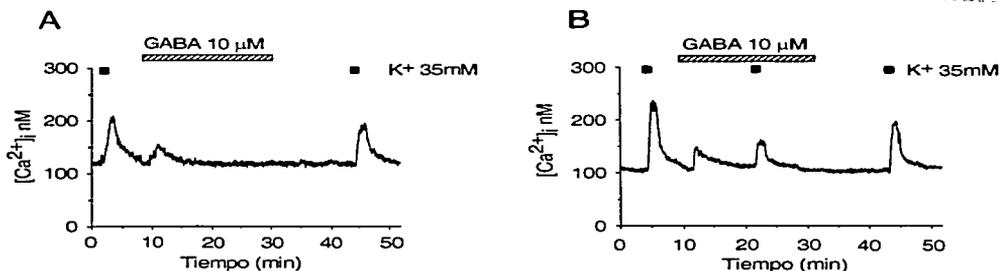


Figura 11. Efecto de la perfusión con $\text{K}^+ 35 \text{ mM}$ y $\text{GABA } 10 \mu\text{M}$ sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En la figura A) se muestra el transitorio de Ca^{2+}_i provocado por la aplicación de $\text{GABA } 10 \mu\text{M}$ durante 25 min. Los trazos que se muestran representan uno de los diez experimentos independientes que se llevaron a cabo para cada grupo experimental. En la gráfica B) se muestra el efecto de GABA

TESTE CON
FALLA EN 19/15

10 μM sobre el transitorio de Ca^{2+}_i inducido por la perfusión de solución ringer 35 mM de K^+ . Obsérvese como la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i inducido por K^+ se reduce significativamente cuando este es perfundido en presencia de GABA.

En cambio, la administración de la solución despolarizante de K^+ durante la aplicación del GABA produjo un transitorio de Ca^{2+}_i significativamente menor en amplitud en comparación con el provocado inmediatamente antes de la aplicación de GABA (Figura 11B). En la figura 15A se muestran los promedios del valor al pico del transitorio de Ca^{2+}_i provocado por K^+ 35 mM ($n=10$) antes (1^{ero}) y durante la aplicación de GABA (2^{do}).

El GABA disminuye la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i provocado por K^+ hasta en un 50% comparado con el transitorio control. Este efecto está mediado a través del receptor GABA_A ya que la administración simultánea de GABA 10 μM y picrotoxina 100 μM (un antagonista no competitivo de los receptores GABA_A), bloquea completamente el efecto inhibitorio del GABA sobre el transitorio de Ca^{2+}_i provocado por alto K^+ (figura 12). Es importante destacar que en estos experimentos no se utilizó bicuculina como antagonista del receptor a GABA ya que esta droga induce un artefacto de fluorescencia que impide la cuantificación correcta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

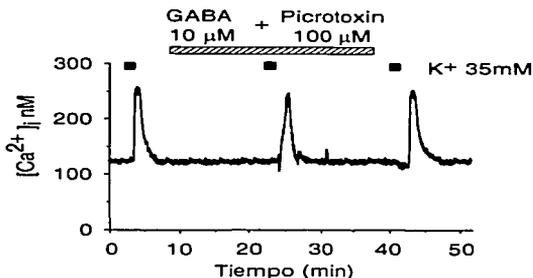


Figura 12. Bloqueo del efecto inhibitorio del GABA por picrotoxina, sobre el transitorio de Ca^{2+}_i inducido por 35 mM de K^+ en células GT_{1-7} . En la gráfica se muestra la acción combinada de la administración de GABA (10 μM) con el antagonista del receptor GABA_A picrotoxina (100 μM) sobre el transitorio de Ca^{2+}_i provocado por 35 mM de K^+ . Obsérvese como la presencia de picrotoxina durante la perfusión inhibe el transitorio de Ca^{2+}_i inicial que provoca el GABA.

TESIS CON
FALLA DE ORIG

Nótese como la amplitud del transitorio de K^+ no disminuye en presencia del GABA. El trazo que se muestra representa uno de los diez experimentos independientes que se llevaron a cabo en este grupo experimental.

Para comprobar que el receptor $GABA_A$ y no el receptor $GABA_B$, es el mediador del efecto de inhibitorio sobre el transitorio de Ca^{2+} inducido por K^+ , perfundimos a las células $GT_{1,7}$ con los agonistas $GABA$ érgicos muscimol y baclofén. En la figura 13A se muestra un experimento típico del transitorio de Ca^{2+}_i provocado por la exposición de las células $GT_{1,7}$ a la solución despolarizante de K^+ en presencia de baclofén ($100 \mu M$), un agonista selectivo a receptores $GABA_B$, el cual no afectó la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i .

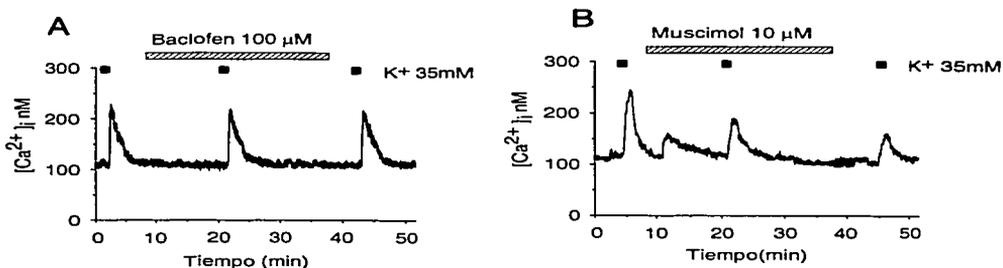


Figura 13. Efecto del muscimol o baclofén sobre el transitorio de Ca^{2+}_i provocado por K^+ en células $GT_{1,7}$. En la figura A) se muestra el efecto de la administración de baclofén ($100 \mu M$), agonista del receptor $GABA_B$, sobre el transitorio de Ca^{2+} inducido por 35 mM de K^+ . En la gráfica B) se muestra el efecto de la administración del agonista al receptor $GABA_A$ muscimol ($10 \mu M$) sobre el transitorio de Ca^{2+} provocado por la perfusión de 35 mM de K^+ . Los trazos que se muestran representan uno de los cinco experimentos independientes que se llevaron a cabo para cada grupo experimental.

Por el contrario, la administración del agonista a receptores $GABA_A$ muscimol ($10 \mu M$) mimetizó el efecto inhibitorio de GABA sobre el transitorio de Ca^{2+}_i provocado por alto K^+ (figura 13B).

Bloqueo del efecto inhibitorio del GABA por AMPc

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para explorar la posibilidad de que la disminución en la concentración de AMPc por la exposición a GABA, pudiera estar jugando un papel en el efecto inhibitorio de la entrada de Ca^{2+} en células GT_{1-7} , perfundimos simultáneamente GABA $10 \mu\text{M}$ y forskolina $20 \mu\text{M}$ (un activador de la adenilato ciclasa). Esta manipulación farmacológica resultó en el bloqueo del efecto inhibitorio del GABA sobre el transitorio de Ca^{2+}_i provocado por la solución despolarizante de K^+ (Figura 14A). Es importante señalar que la aplicación de forskolina no modificó la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i provocado por GABA (Figura 14A). La figura 15B muestra un resumen del bloqueo sobre el efecto inhibitorio del GABA por forskolina.

Para comprobar que el AMPc participa de forma directa sobre el bloqueo de la acción inhibitoria del GABA, perfundimos las células GT_{1-7} con 8-Br-AMPc (1 mM) (una forma de AMPc permeante a la membrana) y GABA ($10 \mu\text{M}$) de forma simultánea (Figura 14B). El resultado obtenido fue similar al observado en el experimento con forskolina, en donde la amplitud del transitorio de Ca^{2+}_i provocado por la exposición de las células GT_{1-7} a la solución despolarizante de K^+ no se vió afectado por la presencia de $10 \mu\text{M}$ de GABA

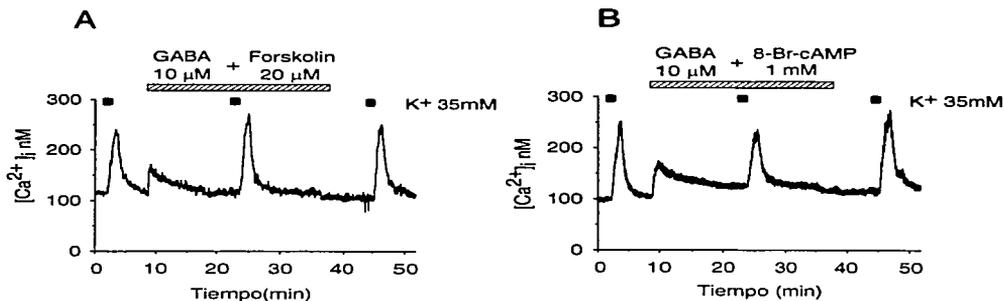


Figura 14. Efecto del GABA en combinación con forskolina (activador de la adenilato ciclasa) u 8-Br-AMPc (análogo del AMPc) sobre el transitorio Ca^{2+} provocado por 35 mM de K^+ en células GT_{1-7} . A) La gráfica muestra el efecto de la acción combinada de $10 \mu\text{M}$ de GABA con $20 \mu\text{M}$ de forskolina sobre el transitorio Ca^{2+} provocados por 35 mM de K^+ . B) La gráfica muestra la acción combinada que tiene el GABA ($10 \mu\text{M}$) y el 8-Br-AMPc (1 mM) sobre el

transitorio de Ca^{+2} , provocados por 35 mM de K^+ . Los trazos que se muestran representan uno de los diez experimentos independientes que se llevaron a cabo para cada grupo experimental.

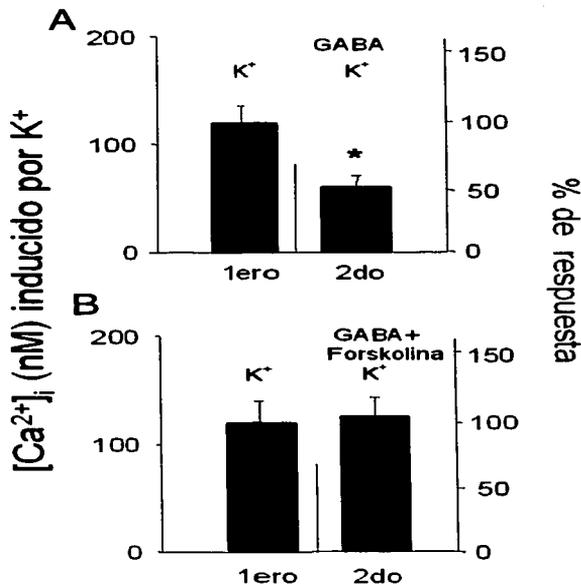


Figura 15. Resumen del efecto del GABA solo o en combinación con forskolina sobre la $[Ca^{+2}]_i$ provocado por K^+ en células GT_{1-7} . A) En la gráfica se observa como el GABA inhibe el aumento en la $[Ca^{+2}]_i$ inducida por K^+ cerca del 50% con referencia al transitorio de Ca^{+2} , control. En B) se muestra como la coadministración de forskolina (20 μ M) revierte el efecto inhibitorio de GABA sobre el transitorio de Ca^{+2} , provocado por K^+ . 1ero se refiere al transitorio de Ca^{+2} , provocado por K^+ antes de la administración de GABA (2^{do}) se refiere al transitorio de Ca^{+2} , provocado por K^+ durante la administración de GABA o de GABA en combinación con forskolina. * $p < 0.05$ vs 1^{er}o.

Discusión

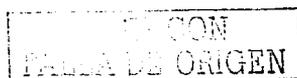
En el presente estudio se demostró que la activación del receptor GABA_B no afecta la formación de AMPc, ni la amplitud de los transitorios de Ca²⁺ inducidos por una solución 35 mM de K⁺. Sin embargo, el hallazgo más revelante de esta tesis radica en el hecho de que la activación crónica del receptor ionotrópico GABA_A inhibe la formación de AMPc y afecta la entrada de Ca²⁺ intracelular cuando las células GT₁₋₇ son despolarizadas con una solución 35 mM de K⁺.

El GABA inhibe la formación de AMPc.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo, se demostró que el GABA tiene un efecto bifásico sobre la secreción de GnRH, es decir, produce una fase estimulante rápida pero transitoria, seguida por una fase de inhibición tardía y tónica de la liberación de esta hormona (Martínez de la Escalera et al., 1994). Además, se ha demostrado que la aplicación de baclofén (agonista del receptor GABA_B) es capaz de inhibir de forma sostenida la secreción pulsátil de GnRH en células GT1. Esta evidencia experimental sugiere que el GABA inhibe la secreción de GnRH a través del receptor GABA_B (Martínez de la Escalera et al., 1994).

El receptor GABA_B ejerce su acción inhibitoria en las neuronas activando una proteína G_{vo}, compuesta por tres subunidades (α , β , γ). La activación de esta proteína G puede inhibir la secreción mediante dos mecanismos: 1) la interacción directa de sus subunidades β/γ con los canales de K⁺ (tipo GIRK) (Andrade et al., 1986; Sodickson y Bean, 1996) y de Ca²⁺ (Dolphin y Scott, 1987; Scholtz y Miller, 1991; Mintz y Bean, 1993) o 2) inhibiendo de manera indirecta la formación de AMPc a través de la interacción de la subunidad α con la adenilato ciclasa (Knight y Bowery, 1996).

Existen evidencias experimentales que muestran como la inhibición de la formación de AMPc, provocada por la estimulación del receptor GABA_B, está asociada a la inhibición de la secreción de hormonas en células endocrinas



como los melanotropos y lactropos (Lux-Lantos et al., 2001; Leenders et al., 1995). En estas células al igual que en las GT_{1-7} también se ha demostrado que el GABA tiene un efecto bifásico sobre la secreción de las hormonas que liberan.

En la presente tesis se exploró la posibilidad de que el receptor $GABA_B$ ejerciera sus efectos inhibitorios sobre las células GnRHérgicas mediante la inhibición de la formación de AMPc. Sin embargo, la activación de estos receptores con el agonista baclofén no mostró tener un efecto directo sobre la formación de este segundo mensajero en las células GT_{1-7} (figura 8A). En contraste, la incubación de las células con GABA y muscimol (agonista de los receptores $GABA_A$), inhibió la formación de AMPc. Además, se observó que la aplicación de dosis crecientes de bicuculina (bloqueador competitivo del receptor $GABA_A$), es capaz de bloquear el efecto inhibitorio del GABA sobre la acumulación del AMPc. Las evidencias experimentales encontradas en esta tesis sugieren que la activación del receptor $GABA_A$ media este efecto. La EC_{50} calculada para la inhibición de la formación de AMPc fué $0.093 \mu M$ para el GABA y $0.022 \mu M$ para el muscimol. Es importante destacar que la presente tesis es el primer estudio en el cual se calcula el valor de EC_{50} , a partir de resultados obtenidos de la medición de AMPc intracelular. Los valores de EC_{50} para la activación del receptor $GABA_A$ reportados en la literatura hasta ahora, se han calculado a partir de la medición de la corriente de Cl^- que es provocada por el GABA o muscimol. El valor reportado de este parámetro varía incluso en estudios realizados usando el mismo tipo celular, por ejemplo, en neuronas de hipocampo este valor fluctúa entre 6.4 y $14.5 \mu M$. (Celentano y Wong, 1994; Shirasaki et al., 1991). Algunos investigadores han propuesto que las diferencias en los valores de EC_{50} dependen de la combinación de subunidades que conforman el receptor $GABA_A$, ejemplo de ello, son los valores de EC_{50} correspondientes a los receptores $GABA_A$ recombinantes expresados en ovocitos ($9-985 \mu M$ Levitan et al., 1988; $1.3-42 \mu M$ Sigel et al., 1990) y células embrionarias de riñón ($17-103 \mu M$ Verdoorn et al., 1990). Aún cuando los valores de EC_{50} para el GABA difieren en la literatura, la concentración necesaria para

activar el flujo de Cl^- a través del receptor GABA_A se encuentra en el rango μM , mientras que el efecto inhibitorio de la formación de AMPc que se encontró en esta tesis se ubica en el rango nanomolar.

Por otra parte, la constante de inhibición (K_i) para la bicuculina fué de 9 nM, valor que corresponde a una pK_i de 8, considerablemente superior la valor de pK_i reportado previamente para el bloqueo de la corriente de Cl^- provocada por GABA ($pK= 5$, Halliwell et al., 2002). La discrepancia en los valores de pK_i significa que la concentración de bicuculina para bloquear el efecto de la formación de AMPc es considerablemente menor a la requerida para bloquear la corriente de Cl^- provocada por la activación del receptor GABA_A . Al igual que en el caso del GABA, se piensa que la diferencia en los valores de este parámetro podrían deberse a la combinación de subunidades que conforman el receptor GABA_A en los distintos tipos de neuronas en donde se ha estudiado el efecto de este antagonista (Nistri y Sivilotti, 1985; Strata y Cherubini, 1994).

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la concentración de GABA necesaria para inhibir la formación de AMPc y la concentración de bicuculina necesaria para bloquear el efecto inhibitorio del GABA, son considerablemente menores a las requeridas para activar y bloquear respectivamente, la corriente de Cl^- del receptor GABA_A . Estas evidencias experimentales sugieren que el flujo de iones Cl^- y el efecto inhibitorio de la formación de AMPc son eventos independientes.

La presente tesis es el primer trabajo donde se reporta que la activación del receptor GABA_A inhibe la formación de AMPc. El mecanismo molecular a través del cual se dá este fenómeno no fue objeto de estudio de esta tesis, sin embargo, a continuación se discuten algunos posibles mecanismos por los cuales la activación del receptor GABA_A pudiera ejercer su efecto inhibitorio sobre la formación de AMPc.

El efecto inhibitorio del GABA sobre la formación de AMPc podría deberse al aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular provocada por la despolarización que ejerce este neurotransmisor en las neuronas GT_{1-7} . En

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

apoyo a esta idea, estudios recientes sugieren que los cambios en la concentración de Ca^{2+} inducidos por la despolarización pueden alterar la producción de AMPc en células no excitables y excitables (Chiono et al., 1995; Cooper et al., 1998; Krsmanovic et al., 2001). Sin embargo, la despolarización de la membrana en células GT_{1-7} provoca una modulación bifásica de la producción de AMPc (Krsmanovic et al., 2001). El grupo de Krsmanovic y colaboradores (2001), demostró que la despolarización progresiva de la membrana evocada por el aumento en la concentración extracelular de K^+ entre 20 y 40 mM, provoca un aumento progresivo de concentración de AMPc, mientras que la incubación de las células en concentraciones de K^+ extracelular de entre 45 y 60 mM inhiben la producción de este segundo mensajero. Los resultados del presente estudio y los valores de IC_{50} del GABA y muscimol sobre la acumulación de AMPc (93 nM y 22 nM respectivamente) calculados en la presente tesis (figuras 7A y 8B), nos llevan a sugerir que la inhibición de la acumulación de AMPc inducido por el GABA parece no estar asociado con el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esta idea se basa en el hecho de que la perfusión de las células con concentraciones de GABA en el rango nM no induce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 10B), pero si puede disminuir la acumulación de AMPc. Estas evidencias descartan la posibilidad de que el Ca^{2+} esté mediando el efecto inhibitorio del GABA sobre la acumulación de AMPc. Otra posible explicación sería que la activación de fosfodiesterasas (enzimas responsables de la degradación de AMPc) disminuyera la concentración de AMPc en estas células. Sin embargo, en la presente tesis se utilizó IBMX (inhibidor de amplio espectro de las fosfodiesterasas) en todas las estimulaciones realizadas con los agonistas GABAérgicos lo cual invalida esta hipótesis.

Los estudios de la estructura y función del receptor GABA_A , muestran que la modulación y activación de este receptor es compleja. El receptor GABA_A es un canal iónico constituido por 5 subunidades, de las cuales se conocen más de 16 isoformas. Cada subunidad puede interactuar con distintos ligandos que regulan la conductancia de este canal. Los sitios de unión conocidos hasta ahora corresponden a dominios extracelulares de las distintas subunidades que lo

conforman. Estudios recientes muestran que un dominio intracelular de la subunidad γ puede interactuar con una proteína del citoesqueleto (Wang et al 1999). Sin embargo, se desconoce si los dominios intracelulares de otras subunidades son capaces de interactuar con otras proteínas del citosol, que puedan modular la conductancia iónica del canal o desencadenar la activación o inhibición de cascadas de segundos mensajeros. El mecanismo por el cual la activación del receptor GABA_A induce la inhibición de la formación de AMPc queda por ser determinado, pero el presente estudio nos motiva a diseñar experimentos encaminados a la búsqueda de proteínas que interactúen con las subunidades del receptor GABA_A y que potencialmente puedan modular la formación de AMPc intracelular o la degradación de este segundo mensajero. Tampoco se puede descartar la posibilidad de la existencia de un receptor a GABA que no haya sido descrito antes, el cual fuese sensible a muscimol y bicuculina e insensible a baclofén y que estuviese acoplado a una proteína $\text{G}_{i/o}$.

Es importante hacer notar que los primeros estudios de unión a GABA radioactivo realizados en membranas de neuronas, sugieren la existencia de al menos dos sitios de unión, uno de alta afinidad ($K_D = 10\text{-}30\text{ nM}$) y otros de baja afinidad ($K_D = 0.1\text{-}1.0\ \mu\text{M}$) (Olsen et al., 1981; Agey y Dunn, 1989). Actualmente se sabe que los receptores GABA_A tienen dos sitios de unión al agonista (Newell et al., 2000). Es bien conocido que el sitio de baja afinidad está asociado a la apertura del canal de Cl^- , pero aún se desconoce cual es el papel que juega el sitio de baja afinidad de este receptor. Algunos investigadores sugieren que este sitio también pudiera estar involucrado en la apertura del canal (Newell et al., 2000), pero la relevancia fisiológica sigue siendo motivo de discusión. Es posible que el sitio de unión a GABA de alta afinidad pudiera estar involucrado en el efecto inhibitorio de la formación de AMPc, ya que el valor de EC_{50} (98 nM) para la inhibición de la acumulación de AMPc se encuentra en el rango nM al igual que la unión al sitio de alta afinidad del receptor GABA_A que se ha detectado. Sin embargo, esta especulación necesita de un profundo estudio de la estructura y función del receptor GABA_A , así como la medición en paralelo de la actividad de la adenilato ciclasa.

El GABA inhibe los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por K^+ .

Aun cuando el receptor $GABA_B$ no mostró tener un efecto directo sobre la formación de AMPc, no se descarta la posibilidad de que este receptor pudiese actuar a través de otro efector. Como se ha mencionado anteriormente, el receptor $GABA_B$ además de disminuir la formación de AMPc también es capaz de modular los canales de Ca^{2+} y K^+ . Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la amplitud del transitorio de Ca^{2+} provocado por la despolarización de la membrana, disminuye significativamente cuando este es evocado en presencia de GABA (Figura 11B). Sin embargo, este efecto parece no estar mediado a través del receptor $GABA_B$ ya que cuando el transitorio Ca^{2+} es evocado en presencia de baclofén (agonista del receptor $GABA_B$), la amplitud del transitorio no se ve afectada (Figura 13A). Este resultado muestra que los receptores $GABA_B$ no modulan la entrada de Ca^{2+} en las células GT_{1-7} . Utilizando el mismo método fluorométrico empleado en esta tesis, algunos grupos han observado una disminución de la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} evocados por despolarización en presencia de baclofén en melanotropos y neuronas del ganglio dorsal (Bertrand et al., 2001; Yokogawa et al., 2001). Además, se ha observado que la disminución en la concentración basal de Ca^{2+} intracelular se da a los pocos segundos de ser aplicado el baclofén en interneuronas estriatales (Pisani et al., 1999). Este fenómeno está relacionado con la activación de los receptores $GABA_B$ que es capaz de hiperpolarizar a la membrana. Estas evidencias experimentales indican que el método fluorométrico utilizado en esta tesis tiene la sensibilidad y resolución temporal suficientes para detectar la posible activación del receptor $GABA_B$ y la potencial regulación que este pudiera haber tenido sobre la regulación de la entrada de Ca^{2+} en las células $GT1$. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la estimulación con baclofén no afecta la $[Ca^{2+}]_i$ basal en las neuronas GT_{1-7} .

Como la estimulación del receptor $GABA_B$ parece no estar mediando la disminución en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} , la atención fue enfocada hacia

el receptor GABA_A. La fase excitadora del GABA y del muscimol previamente descrita y caracterizada en las células GT1 (Hales et al., 1994; Martínez de la Escalera et al., 1994; Spergel et al., 1995; Sun et al., 1997; Defazio et al., 2002) también fue observada en la presente tesis cuando la $[Ca^{2+}]_i$ aumentó al perfundir a las células GT₁₋₇ con GABA y muscimol (figuras 11 y 13B). El fenómeno despolarizante del GABA no es exclusivo de las neuronas GT1. Previamente se ha demostrado que la aplicación de GABA es capaz de despolarizar neuronas disociadas de hipotálamo, cerebelo, hipocampo y neuronas del ganglio dorsal extraídas de ratas de 1 a 5 días de nacidas. La acción excitadora del GABA cambia a inhibitoria cuando las células son extraídas de animales mayores a 6 días de nacidos e incluso en células con más de 20 días en cultivo. El mecanismo por el cual el GABA despolariza a las neuronas está bien documentado. Actualmente existe un consenso general en el campo que explica el fenómeno de la siguiente manera: en las neuronas despolarizables por GABA, el potencial de reversión del Cl⁻, también conocido como potencial electroquímico o E_{Cl⁻}, es más positivo que el potencial de reposo de la membrana. Esta condición iónica indica que la concentración de Cl⁻ se encuentra más elevada dentro de la célula que en su exterior. Al ser activado el receptor GABA_A el poro del canal se abre y el Cl⁻ sale de la célula. La salida de Cl⁻ provoca la despolarización de la membrana lo que permite la activación de canales de Na⁺ y Ca²⁺. La acumulación del Cl⁻ en neuronas inmaduras puede ser causada por la expresión del triple cotransportador 2Cl⁻-Na⁺-K⁺ (Hoope y Kettenmann 1989; LoTurco et al., 1995), por la ausencia de la expresión de un mecanismo de extrusión de iones Cl⁻ como lo es la bomba electroneutra de K⁺-Cl⁻ (Álvarez-Leefmans et al., 1989) y/o por la ausencia de canales rectificadores de la corriente de Cl⁻, también conocidos como CIC (Thiemann et al., 1992, Jentsch et al., 1995). La expresión o supresión de estas proteínas que regulan la $[Cl^-]_i$, provocan que el potencial de equilibrio de este ión sea más positivo que el potencial de reposo de la membrana celular. Sin embargo, las evidencias experimentales más sólidas sugieren que es el cotransportador K⁺-Cl⁻ el principal responsable del cambio en el potencial de equilibrio del Cl⁻ en las neuronas

durante el desarrollo (Ben, 2002). En las neuronas GT1 y GnRHérgicas se ha demostrado que: 1) expresan receptores GABA_A, 2) presentan un potencial de equilibrio de Cl⁻ más positivo que el potencial de membrana y 3) no expresan el cotransportador K⁺-Cl⁻ (Defazio et al., 2002). Los resultados en esta tesis concuerdan con las ideas y evidencias experimentales que se han reportado con anterioridad.

Por otra parte, además del efecto despolarizante del GABA, en la presente tesis también se observó que la perfusión continua con este neurotransmisor o con muscimol, afecta la amplitud del transitorio de Ca²⁺ provocado por la solución despolarizante de K⁺ (figuras 11B y 13B). El mecanismo por el cual la activación del receptor GABA_A afecta a los transitorios de Ca²⁺ no fue objeto de estudio de esta tesis pero a continuación se discuten los posibles mecanismos que pudieran estar involucrados.

El mecanismo más factible por el cual el GABA podría estar mediando la amplitud del transitorio de Ca²⁺ provocado por la solución despolarizante de K⁺, es a través de la entrada de Ca²⁺ que se da durante la fase despolarizante del GABA. El aumento en la [Ca²⁺]_i podría estar modificando las propiedades de conductancia de los canales de Ca²⁺ o el voltaje de activación de los mismos. A continuación se mencionan algunas evidencias experimentales que apoyan esta idea. La despolarización de la membrana puede traer consigo una regulación negativa de la actividad de los canales de Ca²⁺. En las células PC12, por ejemplo, una despolarización prolongada con solución con alto K⁺, causa una disminución en los sitios de unión a [³H]nitrendipina lo cual indica una menor cantidad de canales (DeLorme et al., 1988). En neuronas de rata se ha observado que la despolarización crónica disminuye la densidad de corriente de Ca²⁺ (Fitzpatrick et al., 1984). En células de la pituitaria GH₄C₁, la despolarización durante 2 h disminuye el número de sitios de unión a (+)-[³H]PN200-110 hasta diez veces acompañado por un aumento de 20 veces en la afinidad por la droga (Liu, 1994). Sin embargo, la despolarización también puede causar una regulación positiva de los canales de Ca²⁺ presentes en la membrana. Por ejemplo, en células PC-12-251 e IMR-32 la unión del

radioligando ^{125}I - ω -CgTx en fracciones subcelulares muestra que cerca del 60-80% de los canales de Ca^{2+} tipo N se encuentran primordialmente formando parte de un "pool" intracelular (Sher y Clementi 1991; Pasafaro et al, 1992). Cuando las células son despolarizadas con KCl, el número de sitios de unión a ^{125}I - ω -CgTx en la fracción de la membrana aumenta hasta un 200% en los primeros 10 min. Por otra parte, estudios electrofisiológicos en células de la pituitaria, muestran que la preincubación con 50 mM de K^+ , produce cambios en la densidad de corriente y en el voltaje de activación de los canales de Ca^{2+} tipo L. Esto provoca una disminución de la entrada de Ca^{2+} a la célula y un cambio del umbral de activación de los canales de Ca^{2+} tipo L, efecto que no puede ser mimetizado con veratridina (un activador de canales de Na^+), lo cual indica que la disminución en la densidad de corriente no puede ser atribuida a la inactivación de los canales de Ca^{2+} dependiente del voltaje, ya que este fenómeno no ocurre cuando las células son preincubadas con solución 50 mM de K^+ libre de Ca^{2+} (Peri et al, 2001). En todos estos estudios la regulación negativa o positiva de los canales de Ca^{2+} , depende de la entrada del Ca^{2+} extracelular, ya que al incubar las células en Ringer libre de Ca^{2+} , el efecto de regulación negativa o positiva es bloqueado.

Un mecanismo a través del cual el GABA altera la amplitud del transitorio de Ca^{2+} provocado por el K^+ , podría ser la activación de una proteína G_{Vo} , ya que este tipo de proteína puede reducir la conductancia de los canales de Ca^{2+} de forma directa o a través de la disminución de la concentración de AMPc intracelular (Deisz y Lux 1985; Grassi y Lux 1989). En esta tesis no se utilizaron drogas para bloquear la activación de la proteínas G_{Vo} , sin embargo, se demostró que la estimulación de la adenilato ciclasa con forskolina o el aumento de la concentración de AMPc intracelular perfundiendo a las células con 8-Br-AMPc (análogo del AMPc), pueden bloquear el efecto inhibitorio del GABA sobre la disminución en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} provocado por la solución despolarizante de K^+ (figura 14). Además como se mencionó anteriormente, la activación del receptor GABA_A disminuye la acumulación de AMPc en células GT_{1-7} . Estas evidencias experimentales sugieren que la disminución en la

acumulación de este segundo mensajero podría estar participando en la fase inhibitoria del GABA. El mecanismo molecular por el cual el AMPc actúa sobre la regulación de los canales de Ca^{2+} sigue siendo motivo de estudio, pero se piensa que el grado de fosforilación de estos canales, el cual es modulado por la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), modifica las propiedades de apertura del canal de Ca^{2+} tipo L (Hirayama et al., 1997; Sculptoreanu et al., 1995) el cual es expresado de forma abundante en las células GT1 (Constantin y Charles, 1999; 2001).

La combinación de la entrada de Ca^{2+} a las células GT1 y la disminución en la acumulación de AMPc intracelular podrían ser una explicación razonable del por qué la amplitud del transitorio de Ca^{2+} provocado por K^+ disminuye en presencia de GABA.

Implicaciones fisiológicas

La acción excitadora del GABA sobre las neuronas GT1, contradice un gran número de trabajos donde se sugiere que la activación del receptor GABA_A inhibe a las neuronas GnRHérgicas. Estudios realizados *in vivo* muestran que existe una relación inversa entre la concentración de GABA en el área preóptica y la liberación de LH (Herbison y Dyer, 1991; Jarry et al., 1988). Además, se ha observado que la aplicación de bicuculina aumenta la liberación de LH (Ferreira et al., 1998; Alder et al., 1986). Por otra parte, en primates pre-púberes, se encontró que la administración de antagonistas del receptor GABA_A o el bloqueo de la enzima que sintetiza el GABA (GAD) puede activar la secreción de GnRH de forma prematura iniciando la pubertad (Terasawa et al., 1999). La medición de la liberación de GnRH en explantes de hipotálamo incubados con GABA, arrojan resultados contradictorios. Por ejemplo, la incubación con bicuculina de los fragmentos de tejido cerebral que incluían el hipotálamo medio basal y la región preóptica, provoca un aumento en la secreción de GnRH en el hipotálamo inmaduro pero la disminuye en el hipotálamo maduro (Feleder et al., 1996). Otros reportes muestran que la activación del receptor GABA_A estimula la

secreción de GnRH en fragmentos hipotalámicos que incluían parte de la eminencia media y el núcleo arcuato (Donoso et al., 1992).

La desventaja de estos estudios radica en que la exposición a los agonistas y antagonistas gabaérgicos no es dirigida específicamente a las neuronas GnRHérgicas. Este problema técnico hace pensar que la aplicación de estas drogas podría estar activando o inhibiendo diferentes partes del circuito que controlan la liberación de GnRH. En la presente tesis se utilizaron neuronas GnRHérgicas inmortalizadas (GT1) para evitar este problema. Como anteriormente se ha reportado estas células muestran una respuesta bifásica a la exposición de GABA (Martínez de la Escalera et al., 1994; Sun et al., 1997; Beltran-Parrazal et al., 2001), la fase inhibitoria es evidente cuando las células son expuestas a la solución despolarizante de K^+ en presencia de GABA. Se podría pensar que este efecto se debe a que las neuronas GT1 son una línea celular transformada. Sin embargo, estudios electrofisiológicos recientes muestran que la inyección local de GABA a neuronas GnRHérgicas de rebanadas de cerebro, también ejerce un efecto bifásico de la actividad eléctrica (Difazio et al., 2002; Han et al., 2002).

En resumen, la activación del receptor $GABA_A$ tiene un efecto bifásico sobre la actividad eléctrica, el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y la liberación de GnRH. Por último es posible que el efecto excitador del $GABA_A$ en preparaciones *in vivo*, pudiera estar siendo enmascarado cuando todo el circuito neuronal que controla la secreción de GnRH es expuesto a GABA. Es claro que las neuronas GnRHérgicas expresan receptores $GABA_A$ y presentan entradas sinápticas GABAérgicas directas, pero queda por ser determinado si una señal GABAérgica tónica, como ha sido propuesto en otras áreas del cerebro (Salin y Prince, 1996) e incluso en el mismo sistema GnRHérgico (Terasawa et al., 1999) forma parte de la influencia GABAérgica que modula a las neuronas GnRHérgicas.

Conclusiones

1. Los datos obtenidos en esta tesis sugieren que el GABA provoca una disminución de la formación de AMPc a través de la activación del receptor GABA_A. El mecanismo por el cual la activación del receptor GABA_A disminuye la formación de AMPc queda por ser determinado. Además, el receptor GABA_B no participa en la disminución de la formación de AMPc en las células GT₁₋₇. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que el receptor GABA_B pueda estar activando otros efectores que modulen la maquinaria molecular de la secreción de GnRH, ya que anteriormente se ha reportado que la activación del receptor GABA_B inhibe la secreción de GnRH en células GT1.

2. El receptor GABA_B no modula la entrada de Ca²⁺ en las células GT₁₋₇ provocada por la despolarización de la membrana. Al parecer la regulación de la entrada de Ca²⁺ está en parte modulada por la concentración intracelular de AMPc. Es probable que la inhibición de la formación de AMPc provocada por la activación del GABA_A sea el mecanismo por el cual el GABA disminuye la entrada de Ca²⁺ durante la despolarización de la membrana.

Bibliografía

Adler BA, Crowley WR (1986) Evidence for gamma-aminobutyric acid modulation of ovarian hormonal effects on luteinizing hormone secretion and hypothalamic catecholamine activity in the female rat. *Endocrinology* 118:91-97.

Agey MW, Dunn SM (1989) Kinetics of [3H]muscimol binding to the GABAA receptor in bovine brain membranes. *Biochemistry* 28:4200-4208.

Akema T, Kimura F (1991) The mode of GABAB receptor-mediated inhibition of the preovulatory luteinizing hormone surge in female rats. *Brain Res* 562:169-172.

Alvarez-Leefmans FJ, Nogueron I (1989) Intracellular chloride homeostasis in vertebrate nerve cells. *Acta Physiol Scand Suppl* 582:17.

Alvarez-Leefmans FJ, Leon-Olea M, Mendoza-Sotelo J, Alvarez FJ, Anton B, Garduno R (2001) Immunolocalization of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience* 104:569-582.

Andrade R, Malenka RC, Nicoll RA (1986) A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 234:1261-1265.

Artalejo CR, Rossie S, Perlman RL, Fox AP (1992) Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca²⁺ current facilitation in chromaffin cells. *Nature* 358:63-66.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313.

Beavo JA (1988) Multiple isozymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 22:1-38.

Beltman J, Sonnenburg WK, Beavo JA (1993) The role of protein phosphorylation in the regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Cell Biochem* 127-128:239-253.

Beltran-Parrazal L, Noris G, Clapp C, Martinez de la Escalera G (2001) GABA inhibition of immortalized gonadotropin-releasing hormone neuronal excitability involves GABA(A) receptors negatively coupled to cyclic adenosine monophosphate formation. *Endocrine* 14:189-195.

Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739.

Bergén HT, Hejtmancik JF, Pfaff DW (1991) Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonists and antagonist on LHRH-synthesizing neurons as detected by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Exp Brain Res* 87:46-56.

Bertrand S, Ng GY, Purisai MG, Wolfe SE, Severidit MW, Nouel D, Robitaille R, Low MJ, O'Neill GP, Metters K, Lacaille JC, Chronwall BM, Morris SJ (2001) The anticonvulsant, antihyperalgesic agent gabapentin is an agonist at brain gamma-aminobutyric acid type B receptors negatively coupled to voltage-dependent calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 298:15-24.

Boehm S, Huck S (1995) alpha 2-Adrenoreceptor-mediated inhibition of acetylcholine-induced noradrenaline release from rat sympathetic neurons: an action at voltage-gated Ca²⁺ channels. *Neuroscience* 69:221-231.

Bormann J (1988) Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci* 11:112-116.

Bormann J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21:16-19.

Bosma MM (1993) Ion channel properties and episodic activity in isolated immortalized gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. *J Membr Biol* 136:85-96.

Bowery NG (1993) GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:109-147.

Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002) International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 54:247-264.

Brann DW, Zamorano PL, Putnam-Roberts CD, Mahesh VB (1992) gamma-Aminobutyric acid-opioid interactions in the regulation of gonadotropin secretion in the immature female rat. *Neuroendocrinology* 56:445-452.

Brautigan DL, Pinault FM (1993) Serine phosphorylation of protein tyrosine phosphatase (PTP1B) in HeLa cells in response to analogues of cAMP or diacylglycerol plus okadaic acid. *Mol Cell Biochem* 127-128:121-129.

Carpenter AB (1998) Hipotálamo. En: *Neuroanatomía fundamentos*. Editado por Williams y Wilkins. pp 286-292

Celentano JJ, Wong RK (1994) Multiphasic desensitization of the GABAA receptor in outside-out patches. *Biophys J* 66:1039-1050.

Chebib M, Johnston GA (1999) The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:937-940.

Chen G, Trombley PQ, van den Pol AN (1996) Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J Physiol* 494:451-464.

Chiono M, Mahey R, Tate G, Cooper DM (1995) Capacitative Ca²⁺ entry exclusively inhibits cAMP synthesis in C6-2B glioma cells. Evidence that physiologically evoked Ca²⁺ entry regulates Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase in non-excitabile cells. *J Biol Chem* 270:1149-1155.

Clarke IJ, Cummins JT (1982) The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111:1737-1739.

Clarke IJ, Scott CJ (1993) Studies on the neuronal systems involved in the oestrogen-negative feedback effect on gonadotrophin releasing hormone neurons in the ewe. *Hum Reprod* 8 Suppl 2:2-6.

Cooper DM, Schell MJ, Thorn P, Irvine RF (1998) Regulation of adenylyl cyclase by membrane potential. *J Biol Chem* 273:27703-27707.

Costantin JL, Charles AC (1999) Spontaneous action potentials initiate rhythmic intercellular calcium waves in immortalized hypothalamic (GT1-1) neurons. *J Neurophysiol* 82:429-435.

Costantin JL, Charles AC (2001) Modulation of Ca(2+) signaling by K(+) channels in a hypothalamic neuronal cell line (GT1-1). *J Neurophysiol* 85:295-304.

Cramer OM, Barraclough CA (1975) Failure to detect luteinizing hormone-releasing hormone in third ventricle cerebral spinal fluid under a variety of experimental conditions. *Endocrinology* 96:913-921.

De Waard M, Gurnett CA, Campbell KP (1996) Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels. *Ion Channels* 4:41-87.

DeFazio RA, Heger S, Ojeda SR, Moenter SM (2002) Activation of A-Type gamma-Aminobutyric Acid Receptors Excites Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Mol Endocrinol* 16:2872-2891.

Deisz RA, Lux HD (1985) gamma-Aminobutyric acid-induced depression of calcium currents of chick sensory neurons. *Neurosci Lett* 56:205-210.

DeLorme EM, Rabe CS, McGee R, Jr. (1988) Regulation of the number of functional voltage-sensitive Ca⁺⁺ channels on PC12 cells by chronic changes in membrane potential. *J Pharmacol Exp Ther* 244:838-843.

Dolphin AC, Scott RH (1986) Inhibition of calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones by (-)-baclofen. *Br J Pharmacol* 88:213-220.

Donoso AO, Banzan AM (1984) Effects of increase of brain GABA levels on the hypothalamic-pituitary- luteinizing hormone axis in rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 106:298-304.

Donoso AO, Lopez FJ, Negro-Vilar A (1992) Cross-talk between excitatory and inhibitory amino acids in the regulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 131:1559-1561.

Elias AN, Pahl M, Stone S, Vaziri ND, Valenta LJ (1982)a Modulatory role of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the regulation of gonadotropin secretion in patients with chronic renal failure. *Int J Artif Organs* 5:13-16.

Elias AN, Szekeres AV, Stone S, Valenta LJ (1982)b A presumptive role for gamma-aminobutyric acid in the regulation of gonadotropin secretion in man. *Am J Obstet Gynecol* 144:72-76.

Feleder C, Refojo D, Jarry H, Wuttke W, Moguilevsky JA (1996) Bacterial endotoxin inhibits LHRH secretion following the increased release of hypothalamic GABA levels. Different effects on amino acid neurotransmitter release. *Neuroimmunomodulation* 3:342-351.

Feleder C, Wuttke W, Moguilevsky JA (1999) Effects of the GABA-A receptor agonist and antagonist on the in vitro release of hypothalamic catecholamines: apparent parallelism between these effects and the LHRH secretion in adult male rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:80-84.

Ferreira SA, Hileman SM, Kuehl DE, Jackson GL (1998) 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* 58:1038-1046.

Fink, G (1988). En: Knobil. E., Nelly.JD (Editores). *The Physiology of reproduction*. Raven Press. New York, NY.

Fisher R, Johnston D (1990) Differential modulation of single voltage-gated calcium channels by cholinergic and adrenergic agonists in adult hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 64:1291-1302.

Fitzpatrick DB, Karmazyn M (1984) Comparative effects of calcium channel blocking agents and varying extracellular calcium concentration on hypoxia/reoxygenation and ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *J Pharmacol Exp Ther* 228:761-768.

Gautron JP, Pattou E, Kordon C (1981) Occurrence of higher molecular forms of LHRH in fractionated extracts from rat hypothalamus, cortex and placenta. *Mol Cell Endocrinol* 24:1-15.

Gibson MJ, Miller GM, Silverman AJ (1991) Pulsatile luteinizing hormone secretion in normal female mice and in hypogonadal female mice with preoptic area implants. *Endocrinology* 128:965-971.

Gordon LM, Sauerheber RD, Esgate JA, Dipple I, Marchmont RJ, Houslay MD (1980) The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes. *J Biol Chem* 255:4519-4527.

Grassi F, Lux HD (1989) Voltage-dependent GABA-induced modulation of calcium currents in chick sensory neurons. *Neurosci Lett* 105:113-119.

Gray R, Johnston D (1987) Noradrenaline and beta-adrenoceptor agonists increase activity of voltage-dependent calcium channels in hippocampal neurons. *Nature* 327:620-622.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R.Y., (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Biol Chem*, 260 3440-50.

Gruner W, Silva LR (1994) Omega-conotoxin sensitivity and presynaptic inhibition of glutamatergic sensory neurotransmission in vitro. *J Neurosci* 14:2800-2808.

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

Halliwel RF, Su J, Demuro A, Martinez-Torres A, Miledi R (2002) Characterization of the interaction between a novel convulsant agent, norbiphen, and GABA(A) and other ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 43:778-787.

Han SK, Abraham IM, Herbison AE (2002) Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. *Endocrinology* 143:1459-1466.

Hanahan D (1985) Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315:115-122.

Hartman RD, He JR, Barraclough CA (1990) Gamma-aminobutyric acid-A and -B receptor antagonists increase luteinizing hormone-releasing hormone neuronal responsiveness to intracerebroventricular norepinephrine in ovariectomized estrogen-treated rats. *Endocrinology* 127:1336-1345.

Herbison AE, Dyer RG (1991) Effect on luteinizing hormone secretion of GABA receptor modulation in the medial preoptic area at the time of proestrous luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology* 53:317-320.

Herbison AE, Robinson JE, Skinner DC (1993) Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 57:751-759.

Hess P, Tsien RW (1984) Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* 309:453-456.

Hirayama Y, Hartzell HC (1997) Effects of protein phosphatase and kinase inhibitors on Ca²⁺ and Cl⁻ currents in guinea pig ventricular myocytes. *Mol Pharmacol* 52:725-734.

Hiruma H, Sano A, Kimura F (1994) Injection of bicuculline elicits firing of luteinizing hormone releasing hormone pulse generator in muscimol-treated ovariectomized rats. *Brain Res* 641:191-197.

Hoppe D, Kettenmann H (1989) Carrier-mediated Cl⁻ transport in cultured mouse oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 23:467-475.

Horvath TL, Naftolin F, Leranth C (1993) Luteinizing hormone-releasing hormone and gamma-aminobutyric acid neurons in the medial preoptic area are synaptic targets of dopamine axons originating in anterior periventricular areas. *J Neuroendocrinol* 5:71-79.

Houslay MD (1990) The use of selective inhibitors and computer modelling to evaluate the role of specific high affinity cyclic AMP phosphodiesterases in the hormonal regulation of hepatocyte intracellular cyclic AMP concentrations. *Cell Signal* 2:85-98.

Iversen, S., Iversen, L., Saper, C. (2000) *The Autonomic nervous system y Hypothalamus En: Principles of neuronal sciences* (Editores) Kyel, ER., Schwartz, JH. Jessell TM. MacGraw-Hill press. pp 960-980.

Iyengar R (1993) Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *Faseb J* 7:768-775.

Jackson H, Usherwood PN (1988) Spider toxins as tools for dissecting elements of excitatory amino acid transmission. *Trends Neurosci* 11:278-283.

Jarry H, Perschl A, Wuttke W (1988) Further evidence that preoptic anterior hypothalamic GABAergic neurons are part of the GnRH pulse and surge generator. *Acta Endocrinol (Copenh)* 118:573-579.

Jarry H, Leonhardt S, Wuttke W (1991) Gamma-aminobutyric acid neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area synchronize the phasic activity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 53:261-267.

Jarry H, Hirsch B, Leonhardt S, Wuttke W (1992) Amino acid neurotransmitter release in the preoptic area of rats during the positive feedback actions of estradiol on LH release. *Neuroendocrinology* 56:133-140.

Jarry H, Leonhardt S, Wuttke W (1995) The inhibitory effect of beta-endorphin on LH release in ovariectomized rats does not involve the preoptic GABAergic system. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103:317-323.

Jentsch TJ, Gunther W, Pusch M, Schwappach B (1995) Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *J Physiol* 482:19S-25S.

Kasuya E, Nyberg CL, Mogi K, Terasawa E (1999) 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* 140:705-712.

Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B (1997) Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:239-246.

Kavalali ET, Hwang KS, Plummer MR (1997) cAMP-dependent enhancement of dihydropyridine-sensitive calcium channel availability in hippocampal neurons. *J Neurosci* 17:5334-5348.

Kimura F, Sano A, Hiruma H, Funabashi T (1993) Effects of gamma-aminobutyric acid-A receptor antagonist, bicuculline, on the electrical activity of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 57:605-614.

King TS, Potter D, Kang IS, Norris C, Chen E, Schenken RS, Javors MA (1999) Concentration-dependent effects of muscimol to enhance pulsatile GnRH release from GT1-7 neurons in vitro. *Brain Res* 824:56-62.

Knight AR, Bowery NG (1996) The pharmacology of adenylyl cyclase modulation by GABAB receptors in rat brain slices. *Neuropharmacology* 35:703-712.

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

Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Mertz LM, Tomic M, Catt KJ (1993) Expression of gonadotropin-releasing hormone receptors and autocrine regulation of neuropeptide release in immortalized hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3908-3912.

Krsmanovic LZ, Mores N, Navarro CE, Tomic M, Catt KJ (2001) Regulation of Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclase in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol* 15:429-440.

Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC (1999) Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science* 283:74-77.

Kusano K, Fueshko S, Gainer H, Wray S (1995) Electrical and synaptic properties of embryonic luteinizing hormone-releasing hormone neurons in explant cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3918-3922.

Lado-Abeal J, Liz JL, Rey C, Febrero M, Cabezas-Cerrato J (1996) Effects of valproate-induced alteration of the GABAergic system on pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized women. *Eur J Endocrinol* 135:293-298.

Lamberts R, Vijayan E, Graf M, Mansky T, Wuttke W (1983) Involvement of preoptic-anterior hypothalamic GABA neurons in the regulation of pituitary LH and prolactin release. *Exp Brain Res* 52:356-362.

Laxminarayana D, Berrada A, Kammer GM (1993) Early events of human T lymphocyte activation are associated with type I protein kinase A activity. *J Clin Invest* 92:2207-2214.

Leenders HJ, Jenks BG, Roubos EW (1995) Inhibition of alpha-MSH secretion is associated with increased cyclic-AMP egress from the neurointermediate lobe of *Xenopus laevis*. *Life Sci* 57:2447-2453.

Levine JE, Ramirez VD (1982) Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology* 111:1439-1448.

Levitan ES, Blair LA, Dionne VE, Barnard EA (1988) Biophysical and pharmacological properties of cloned GABAA receptor subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 1:773-781.

Levitzki A (1988) From epinephrine to cyclic AMP. *Science* 241:800-806.

Liu J, Bangalore R, Rutledge A, Triggle DJ (1994) Modulation of L-type Ca²⁺ channels in clonal rat pituitary cells by membrane depolarization. *Mol Pharmacol* 45:1198-1206.

Livesey SA, Martin TJ (1988) Selective activation of the cAMP-dependent protein kinase isoenzymes. *Methods Enzymol* 159:105-118.

Llinas R, Sugimori M, Silver RB (1992)a Presynaptic calcium concentration microdomains and transmitter release. *J Physiol Paris* 86:135-138.

Llinas R, Sugimori M, Silver RB (1992)b Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256:677-679.

- Llinas R, Sugimori M, Silver RB (1992)c Presynaptic calcium concentration microdomains and transmitter release. *J Physiol Paris* 86:135-138.
- Lux-Lantos V, Becu-Villalobos D, Bianchi M, Rey-Roldan E, Chamson-Reig A, Pignataro O, Libertun C (2001) GABA(B) receptors in anterior pituitary cells. Mechanism of action coupled to endocrine effects. *Neuroendocrinology* 73:334-343.
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15:1287-1298.
- Martinez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI (1992)a 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* 89:1852-1855.
- Martinez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI (1994) Biphasic gabaergic regulation of GnRH secretion in GT1 cell lines. *Neuroendocrinology* 59:420-425.
- Mason AJ, Pitts SL, Nikolics K, Szonyi E, Wilcox JN, Seeburg PH, Stewart TA (1986) The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy. *Science* 234:1372-1378.
- Masotto C, Wisniewski G, Negro-Vilar A (1989) Different gamma-aminobutyric acid receptor subtypes are involved in the regulation of opiate-dependent and independent luteinizing hormone- releasing hormone secretion. *Endocrinology* 125:548-553.
- McCann SM, Rettori V (1986) Gamma amino butyric acid (GABA) controls anterior pituitary hormone secretion. *Adv Biochem Psychopharmacol* 42:173-189.
- McCleskey EW (1994) Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 4:304-312.
- Melis GB, Mais V, Paoletti AM, Beneventi F, Petacchi FD, Fioretti P (1986) Involvement of endogenous gabaergic system in the modulation of gonadotropin secretion in normal cycling women. *J Endocrinol Invest* 9:71-76.
- Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5:1-10.
- Miledi R (1973) Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 183:421-425.
- Mintz IM, Bean BP (1993) GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* 10:889-898.

Mitsushima D, Hei DL, Terasawa E (1994) 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* 91:395-399.

Mitsushima D, Marzban F, Luchansky LL, Burich AJ; Keen KL, Durning M, Golos TG, Terasawa E (1996) Role of glutamic acid decarboxylase in the prepubertal inhibition of the luteinizing hormone releasing hormone release in female rhesus monkeys. *J Neurosci* 16:2563-2573.

Moguilevsky JA, Carbone S, Szwarcfarb B, Rondina D (1991) Sexual maturation modifies the GABAergic control of gonadotrophin secretion in female rats. *Brain Res* 563:12-16.

Muske LE (1993) Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems. *Brain Behav Evol* 42:215-230.

Newell JG, Davies M, Bateson AN, Dunn SM (2000) Tyrosine 62 of the gamma-aminobutyric acid type A receptor beta 2 subunit is an important determinant of high affinity agonist binding. *J Biol Chem* 275:14198-14204.

Nikolarakis KE, Loeffler JP, Almeida OF, Herz A (1988) Pre- and postsynaptic actions of GABA on the release of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Brain Res Bull* 21:677-683.

Nistri A, Sivilotti L (1985) An unusual effect of gamma-aminobutyric acid on synaptic transmission of frog tectal neurones in vitro. *Br J Pharmacol* 85:917-921.

Obrietan K, van den Pol AN (1998) GABAB receptor-mediated inhibition of GABA_A receptor calcium elevations in developing hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 79:1360-1370.

Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63:823-867.

Olsen RW, Bergman MO, Van Ness PC, Lummis SC, Watkins AE, Napias C, Greenlee DV (1981) gamma-Aminobutyric acid receptor binding in mammalian brain. Heterogeneity of binding sites. *Mol Pharmacol* 19:217-227.

Olsen RW, DeLorey TM, Gordey M, Kang MH (1999) GABA receptor function and epilepsy. *Adv Neurol* 79:499-510.

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

Pasha KV, Vijayan E (1992) Acute and short-term effects of intraventricular injection of somatostatin and LHRH on glutamate and GABA levels in rat brain. *Biochem Int* 26:7-15.

- Passafaro M, Clementi F, Sher E (1992) Metabolism of omega-conotoxin-sensitive voltage-operated calcium channels in human neuroblastoma cells: modulation by cell differentiation and anti-channel antibodies. *J Neurosci* 12:3372-3379.
- Payne JA (1997) Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for $[K^+]_o$ regulation. *Am J Physiol* 273:C1516-1525.
- Peri R, Triggle DJ, Singh S (2001) Regulation of L-type calcium channels in pituitary GH(4)C(1) cells by depolarization. *J Biol Chem* 276:31667-31673.
- Peters BP, Krzesicki RF, Perini F, Ruddon RW (1989) O-glycosylation of the alpha-subunit does not limit the assembly of chorionic gonadotropin alpha beta dimer in human malignant and nonmalignant trophoblast cells. *Endocrinology* 124:1602-1612.
- Pisani A, Calabresi P, Centonze D, Marfia GA, Bernardi G (1999) Electrophysiological recordings and calcium measurements in striatal large aspiny interneurons in response to combined O₂/glucose deprivation. *J Neurophysiol* 81:2508-2516.
- Popovic V, Spremovic-Radjenovic S, Eric-Marinkovic J, Grossman A (1996) Effect of sodium valproate on luteinizing hormone secretion in pre- and postmenopausal women and its modulation by naloxone infusion. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2520-2524.
- Reuter H, Beeler GW, Jr. (1969) Calcium current and activation of contraction in ventricular myocardial fibers. *Science* 163:399-401.
- Reuter H, Scholz H (1977) The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline. *J Physiol* 264:49-62.
- Reuter H (1995) Measurements of exocytosis from single presynaptic nerve terminals reveal heterogeneous inhibition by Ca(2⁺)-channel blockers. *Neuron* 14:773-779.
- Riley WD, DeLange RJ, Bratvold GE, Krebs EG (1968) Reversal of phosphorylase kinase activation. *J Biol Chem* 243:2209-2215.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvoori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-255.
- Rosenmund C, Carr DW, Bergeson SE, Nilaver G, Scott JD, Westbrook GL (1994) Anchoring of protein kinase A is required for modulation of AMPA/kainate receptors on hippocampal neurons. *Nature* 368:853-856.
- Salin PA, Prince DA (1996) Spontaneous GABAA receptor-mediated inhibitory currents in adult rat somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 75:1573-1588.

Santos AE, Carvalho CM, Macedo TA, Carvalho AP (1995) Regulation of intracellular $[Ca^{2+}]$ and GABA release by presynaptic GABAB receptors in rat cerebrocortical synaptosomes. *Neurochem Int* 27:397-406.

Scholz KP, Miller RJ (1991) GABAB receptor-mediated inhibition of Ca^{2+} currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* 444:669-686.

Schwanzel-Fukuda M (1999) Origin and migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mammals. *Microsc Res Tech* 44:2-10.

Scott CJ, Clarke IJ (1993) Evidence that changes in the function of the subtypes of the receptors for gamma-amino butyric acid may be involved in the seasonal changes in the negative-feedback effects of estrogen on gonadotropin-releasing hormone secretion and plasma luteinizing hormone levels in the ewe. *Endocrinology* 133:2904-2912.

Scott JD, McCartney S (1994) Localization of A-kinase through anchoring proteins. *Mol Endocrinol* 8:5-11.

Scout J.D. 1993. "Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases" En: *Intracellular Messengers*. Editado por CW Tasydor. Pergamon Press Oxford.

Sculptoreanu A, Figourov A, De Groat WC (1995) Voltage-dependent potentiation of neuronal L-type calcium channels due to state-dependent phosphorylation. *Am J Physiol* 269:C725-732.

Seeburg PH, Adelman JP (1984) Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature* 311:666-668.

Shacter E, Stadtman ER, Jurgensen SR, Chock PB (1988) Role of cAMP in cyclic cascade regulation. *Methods Enzymol* 159:3-19.

Sheffield JW, O'Shaughnessy PJ (1989) Effect of injection of gonadotrophin-releasing hormone on testicular steroidogenesis in the hypogonadal (hpg) mouse. *J Reprod Fertil* 86:609-617.

Sher E, Biancardi E, Pollo A, Carbone E, Li G, Wollheim CB, Clementi F (1992) omega-Conotoxin-sensitive, voltage-operated Ca^{2+} channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol* 216:407-414.

Shirasaki T, Klee MR, Nakaye T, Akaike N (1991) Differential blockade of bicuculline and strychnine on GABA- and glycine-induced responses in dissociated rat hippocampal pyramidal cells. *Brain Res* 561:77-83.

Sigel E, Baur R, Trube G, Mohler H, Malherbe P (1990) The effect of subunit composition of rat brain GABAA receptors on channel function. *Neuron* 5:703-711.

- Silverman AJ, Kokoris GJ, Gibson MJ (1988) Quantitative analysis of synaptic input to gonadotropin-releasing hormone neurons in normal mice and hpg mice with preoptic area grafts. *Brain Res* 443:367-372.
- Silverman AJ, Millar RP, King JA, Zhuang X, Silver R (1994) Mast cells with gonadotropin-releasing hormone-like immunoreactivity in the brain of doves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3695-3699.
- Smith MA, Vale WW (1981) Desensitization to gonadotropin-releasing hormone observed in superfused pituitary cells on Cytodex beads. *Endocrinology* 108:752-759.
- Smith TA (2001) Type A gamma-aminobutyric acid (GABAA) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment. *Br J Biomed Sci* 58:111-121.
- Snutch TP, Leonard JP, Gilbert MM, Lester HA, Davidson N (1990) Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3391-3395.
- Sodickson DL, Bean BP (1996) GABAB receptor-activated inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons. *J Neurosci* 16:6374-6385.
- Spergel DJ, Krsmanovic LZ, Stojilkovic SS, Catt KJ (1995) 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* 61:499-508.
- Stadtman ER, Chock PB (1977) Superiority of interconvertible enzyme cascades in metabolic regulation: analysis of monocyclic systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:2761-2765.
- Strata F, Cherubini E (1994) Transient expression of a novel type of GABA response in rat CA3 hippocampal neurones during development. *J Physiol* 480:493-503.
- Sun W, Jarry H, Wuttke W, Kim K (1997) Gonadotropin releasing hormone modulates gamma-aminobutyric acid-evoked intracellular calcium increase in immortalized hypothalamic gonadotropin releasing hormone neurons. *Brain Res* 747:70-77.
- Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Greengard P (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14:385-397.
- Sutherland EW, Robison GA (1966) The role of cyclic-3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. *Pharmacol Rev* 18:145-161.
- Tareilus E, Breer H (1995) Presynaptic calcium channels: pharmacology and regulation. *Neurochem Int* 26:539-558.

- Tatebayashi H, Ogata N (1992) GABAB-mediated modulation of the voltage-gated Ca²⁺ channels. *Gen Pharmacol* 23:309-316.
- Terasawa E (1994) Steroid modulation of pulsatile LHRH release in the rhesus monkey. *Horm Behav* 28:406-416.
- Terasawa E (1998) Cellular mechanism of pulsatile LHRH release. *Gen Comp Endocrinol* 112:283-295.
- Terasawa E, Luchansky LL, Kasuya E, Nyberg CL (1999) An increase in glutamate release follows a decrease in gamma aminobutyric acid and the pubertal increase in luteinizing hormone releasing hormone release in the female rhesus monkeys. *J Neuroendocrinol* 11:275-282.
- Thiemann A, Grunder S, Pusch M, Jentsch TJ (1992) A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356:57-60.
- Tonks NK, Flint AJ, Gebbink MF, Sun H, Yang Q (1993) Signal transduction and protein tyrosine dephosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 28:203-210.
- Trautwein W, Hescheler J (1990) Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins. *Annu Rev Physiol* 52:257-274.
- Tsien RW, Giles W, Greengard P (1972) Cyclic AMP mediates the effects of adrenaline on cardiac purkinje fibres. *Nat New Biol* 240:181-183.
- Urbanski HF, Rodrigues SM, Garyfallou VT, Kohama SG (1998) Regional distribution of glutamic acid decarboxylase (GAD65 and GAD67) mRNA in the hypothalamus of male rhesus macaques before and after puberty. *Brain Res Mol Brain Res* 57:86-91.
- Verdoorn TA, Draguhn A, Ymer S, Seeburg PH, Sakmann B (1990) Functional properties of recombinant rat GABA_A receptors depend upon subunit composition. *Neuron* 4:919-928.
- Verhage M, Ghijsen WE, Lopes da Silva FH (1994) Presynaptic plasticity: the regulation of Ca²⁺-dependent transmitter release. *Prog Neurobiol* 42:539-574.
- Wagner S, Castel M, Gainer H, Yarom Y (1997) GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* 387:598-603.
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW (1999) GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397:69-72.

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

Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 243:3763-3765.

Wells JN, Miller JR (1988) Methylxanthine inhibitors of phosphodiesterases. *Methods Enzymol* 159:489-496.

Wetsel WC, Valenca MM, Merchenthaler I, Liposits Z, Lopez FJ, Weiner RI, Mellon PL, Negro-Vilar A (1992) Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4149-4153.

Windle JJ, Weiner RI, Mellon PL (1990) Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 4:597-603.

Wu LG, Saggau P (1995) Block of multiple presynaptic calcium channel types by omega-conotoxin-MV1C at hippocampal CA3 to CA1 synapses. *J Neurophysiol* 73:1965-1972.

Yokogawa T, Kim SU, Krieger C, Puil E (2001) Analysis of GABA(A)- and GABA(B)-receptor mediated effects on intracellular Ca(2+) in DRG hybrid neurones. *Br J Pharmacol* 134:98-107.

Yue DT, Herzig S, Marban E (1990) Beta-adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:753-757.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GABA Inhibition of Immortalized Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Excitability Involves GABA_A Receptors Negatively Coupled to Cyclic Adenosine Monophosphate Formation

Luis Beltrán-Parrazal, Gino Noris, Carmen Clapp, and Gonzalo Martínez de la Escalera

Neurobiology Center, National University of Mexico, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, Qro, Mexico

γ -Aminobutyric acid (GABA) has been implicated in the regulation of reproduction, particularly in the developmental modulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion. GnRH neurons are innervated by GABA-containing processes, and the administration of GABA stimulates and inhibits GnRH secretion *in vivo* and *in vitro*. We have previously shown that GABA can exert both of these actions in sequence, by acting directly on immortalized GnRH neurons. While the stimulation is the result of a GABA_A receptor-mediated depolarization of the plasma membrane, the mechanism involved in the delayed inhibition is the subject of the present investigation. GABA (1 nM–10 μ M) decreased the intracellular concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in a dose- and time-dependent fashion. This effect was blocked by bicuculline and mimicked by muscimol but not by baclofen. To analyze the effect of GABA on cellular excitability, we used fura-2 loaded GT1-7 cells. Activation of voltage-sensitive calcium channels by high K⁺-induced depolarization (35 mM) increased [Ca²⁺]_i. GABA (10 μ M) and muscimol (10 μ M) reduced the amplitude of K⁺-induced [Ca²⁺]_i transients. This inhibition was blocked by forskolin (20 μ M) or 8-Br-cAMP (1 mM). Altogether, these results show that GABA_A receptors mediate a sustained inhibitory effect of GABA on GnRH neurons, and suggest the involvement of the cAMP pathway decreasing cellular excitability.

Key Words: GABA; GABA_A-receptors; gonadotropin-releasing hormone; GT1-7 cells; cyclic adenosine monophosphate.

Introduction

The neuropeptide gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is at the top of the endocrine axis that controls reproductive function and is released into the hypophysial portal circulation in a pulsatile fashion. This episodic pattern is necessary for the normal operation of the axis, such as the secretion of preovulatory luteinizing hormone surges and ovulation (1). A variety of experimental approaches have made clear that the synchronous release of GnRH is under the regulatory control of stimulatory and inhibitory neuronal inputs (2). Stimulation and inhibition of synchronous release of GnRH can be induced through various neurotransmitter systems, including γ -aminobutyric acid (GABA).

Morphologic studies in rodents have revealed that GnRH neurons are innervated by GABAergic terminals. Synaptic contacts between GABA-containing processes and GnRH neurons in the medial preoptic area and median eminence of the rat (3,4) and expression of three classes ($\alpha_{1/2}$, β_3 and γ_2) of GABA_A receptor subunits in rat GnRH neurons were demonstrated by double-label immunohistochemistry and *in situ* hybridization (5,6). Pharmacological manipulation of GABA-ergic neurons has led to the conclusion that GABA innervation is able to mediate both stimulatory and inhibitory actions on GnRH secretion. GABA stimulates GnRH release in embryonic (7) and neonatal (8) hypothalamus, although is generally considered inhibitory to hypothalamic GnRH release in adult rats (9–11). GABA_A-receptor activation results in two different responses, depending on the developmental stage of the animals. While prepubertal rats respond with an increase in GnRH output, adult animals respond with a reduction in the release of this hormone (8). In contrast to these actions in rodents, a GABAergic inhibitory tone is particularly important as a major restraining influence on GnRH release in prepubertal rhesus monkeys (12), where direct synaptic contacts between GABA and GnRH neurons have not been detected (13).

Experiments with immortalized GnRH neurons of the GT1 lineage, which release GnRH in pulses (14–16) at a frequency quite similar to that observed in perfused rat hypothalamic explants (17,18), demonstrated that GABA

Received June 22, 2000; Revised September 1, 2000; Accepted September 8, 2000.

Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed: Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, 76220 Querétaro, Qro, Mexico. E-mail: gmel@servidor.unam.mx

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA 79

NO SE PUEDE SALEN
DE LA BIBLIOTECA

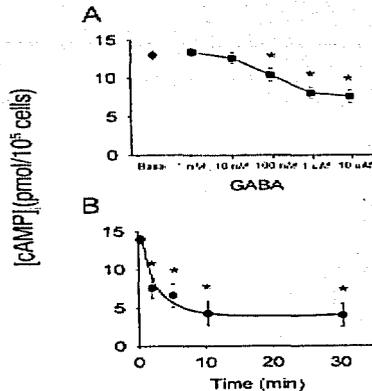


Fig. 1. Effect of GABA on cAMP content in GT1-7 cells. (A) Dose-response relationship for GABA-induced inhibition of cAMP accumulation in 30 min in GT1-7 cells, incubated for 90 min in the presence of 1 mM IBMX; (B) time course of GABA-induced (10 μM) inhibition of cAMP formation. Values represent the mean ± SEM of six independent determinations. **p* < 0.05 vs basal value before the administration of GABA.

can exert both stimulatory and inhibitory actions by acting directly on GnRH neurons (19,20). GT1 neurons express functional GABA_A receptors composed only by α- and β-subunits (19,21), whose activation rapidly leads to chloride efflux, membrane depolarization, increased intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i), and a single episode of GnRH secretion (19-22). This evanescent stimulatory action of GABA is followed by a long-lasting decrease of GnRH secretion and [Ca²⁺]_i to levels below basal values and without their characteristic spontaneous oscillations (20,23).

In the present study we analyzed the nature of the signaling pathways involved in the delayed inhibitory effect of GABA. In particular, we addressed the effect of GABA on the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathway and on cellular excitability. Our results demonstrate that GABA inhibits the formation of cAMP and the excitability of GT1-7 cells via the activation of GABA_A receptors and suggest that inhibition of this signaling pathway may be responsible for the inhibitory action of GABA on the excitability of these cells.

Results

GABA Inhibition of cAMP Accumulation in GT1-7 Cells

The administration of GABA decreased the accumulation of cAMP in GT1-7 cells in a dose- and time-dependent manner (Fig. 1). Incubation of GT1-7 cells for 30 min with

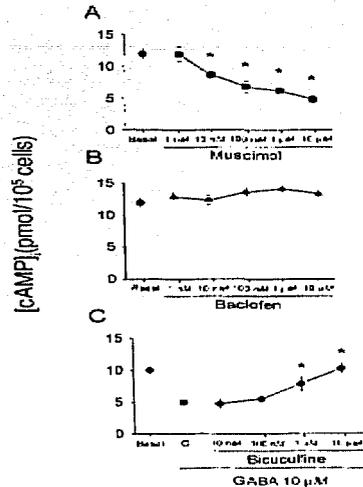


Fig. 2. Effect of muscimol, baclofen, and GABA alone or together with bicuculline on cAMP content in GT1-7 cells. GT1-7 cells (incubated for 90 min in the presence of 1 mM IBMX) were challenged for 30 min with increasing concentrations of the GABA_A-receptor agonist muscimol (A), the GABA_B-receptor agonist baclofen (B), or with a single concentration of GABA (10 μM) alone or in combination with increasing concentrations of the GABA_A-receptor antagonist bicuculline (C). Values represent the mean ± SEM of six independent determinations. **p* < 0.05 vs basal value before the administration of GABA.

increasing concentrations of GABA in the presence of the phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (1 mM), resulted in statistically significant inhibitions of the intracellular concentration of cAMP in response to 100 nM, 1 μM, and 10 μM GABA (Fig. 1A). cAMP levels gradually decreased in response to 10 μM GABA, becoming statistically lower than the basal value in only 2 min and reaching a minimum after 10 min of treatment (Fig. 1B). Treatment of GT1-7 cells with the selective GABA_A-receptor agonist muscimol, but not with the GABA_B-receptor agonist baclofen, mimicked the dose-response inhibition of intracellular cAMP accumulation induced by GABA (Fig. 2A,B). Figure 2C shows that the inhibition of cAMP accumulation induced by 10 μM GABA was totally reversed by the coadministration of equimolar concentrations of the selective GABA_A-receptor antagonist bicuculline. A lower concentration of bicuculline (1 μM) produced a partial antagonism of the inhibitory effect of GABA on cAMP formation.

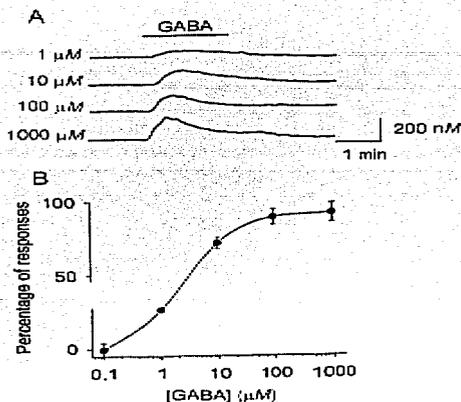


Fig. 3. Dose-response relationship for GABA-evoked $[Ca^{2+}]_i$ transients in GT1-7 cells. (A) Traces showing $[Ca^{2+}]_i$ transients evoked by 1, 10, 100, and 1000 μM in fura-2-loaded GT1-7 cell populations; (B) dose-response curve for the GABA-evoked $[Ca^{2+}]_i$ transients. Data were collected in seven independent recordings. The $[Ca^{2+}]_i$ transient evoked by 1000 μM GABA was normalized to 100%. The curve is the best fit of data to the logistic equation $Y = E_{max} / (1 + (EC_{50} / X)^n)$ in which X is the concentration of GABA, and Y is the fraction of the maximum value; EC_{50} was 2.9 μM . The Hill coefficient (n) was assumed to be 1.

GABA Inhibition of K^+ -Induced $[Ca^{2+}]_i$ Transients in GT1-7 Cells

By using fura-2 fluorometric recordings, we determined the effects of GABA on the resting level of $[Ca^{2+}]_i$ and on the amplitude of K^+ -induced $[Ca^{2+}]_i$ transients in populations of GT1-7 cells. Under the present experimental conditions, GT1-7 cells showed stable basal $[Ca^{2+}]_i$ (108 ± 10.3 nM; $n = 45$). The administration of GABA resulted in concentration-dependent $[Ca^{2+}]_i$ transient responses (Fig. 3). We examined seven cultures to generate a dose-response curve for GABA. None of the cultures responded to 0.1 μM GABA. In all of them, 1 μM GABA infused for 120 s induced a measurable rapid and transient $[Ca^{2+}]_i$ response. At concentrations of 10–100 μM , GABA reliably evoked responses of progressively higher amplitude. The effect induced by 1000 μM was similar to that induced by 100 μM GABA. The concentration at which GABA evoked a half-maximal response (EC_{50}) was 4.5 μM (Fig. 3B). These responses were blocked by the GABA_A-receptor antagonist picrotoxin (data not shown).

A typical series of $[Ca^{2+}]_i$ responses to repeated (20 min apart) short-term (120 s) infusions of high K^+ concentrations (35 mM) are shown in Fig. 4. These responses were

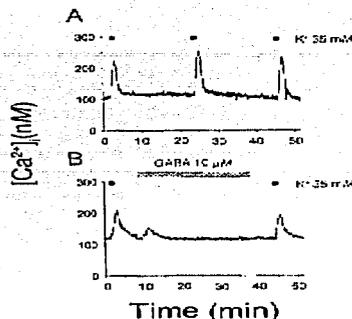


Fig. 4. Effect of 35 mM $[K^+]_o$ and GABA on $[Ca^{2+}]_i$ in GT1-7 cells. $[Ca^{2+}]_i$ was measured in fura-2-loaded, cover slip-attached GT1-7 cell populations by spectrofluorometry. The horizontal bars above each trace indicate the time period during which external conditions were changed. (A) Effect of repeated exogenous challenges (120 s) with 35 mM $[K^+]_o$; (B) effect of long-term (25 min) administration of GABA (10 μM). Traces represent typical responses obtained in at least 10 independent experiments performed for each condition.

highly reproducible within each culture (Fig. 4A), reaching an average amplitude of 210 ± 23 nM ($n = 10$). The sustained infusion of GABA (10 μM) for 30 min induced a rapid and transient rise in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 4B). $[Ca^{2+}]_i$ rapidly increased to peak at average values of 150 ± 15 nM and then decreased to return to basal levels between 5 and 8 min after the onset of GABA infusion. The administration of high K^+ , 5 min after the suspension of GABA infusion, produced $[Ca^{2+}]_i$ responses of similar amplitude to those induced by K^+ just before the infusion of GABA.

However, $[Ca^{2+}]_i$ responses triggered by high K^+ were substantially and reversibly affected during long-term infusions of GABA (Fig. 5A). The amplitude of the K^+ -induced $[Ca^{2+}]_i$ transient responses during GABA infusion reached a peak value roughly one-half of the value reached just before the infusion of GABA. The amplitude of the transient responses triggered by K^+ infused right after the end of the infusion of GABA showed a partial recovery. Figure 6A shows the average amplitude of 10 $[Ca^{2+}]_i$ responses triggered by K^+ infused before (1st column) and during (15 min after the onset, 2nd column) the administration of GABA. GABA decreased the amplitude of the K^+ -induced $[Ca^{2+}]_i$ transients to 157 ± 15 nM (i.e., 50% lower than the corresponding controls). Coadministration of the GABA_A-receptor antagonist picrotoxin (100 μM) completely blocked both of the effects of GABA (10 μM), that is, the rapid and transient stimulation of $[Ca^{2+}]_i$ and the inhibition of the amplitude of K^+ -triggered $[Ca^{2+}]_i$ transients (Fig. 5B).

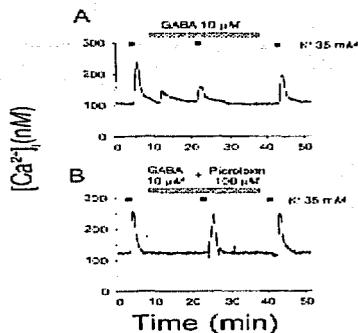


Fig. 5. Effect of GABA or GABA plus picrotoxin on K⁺-evoked [Ca²⁺]_i transients in GT1-7 cells. (A) Effect of GABA (10 μM) on [Ca²⁺]_i transients evoked by 35 mM [K⁺]_i; (B) effect of the combined administration of 10 μM GABA with the GABA_A-receptor antagonist picrotoxin (100 μM) on [Ca²⁺]_i transients evoked by 35 mM [K⁺]_i. Traces represent typical responses obtained in 10 independent experiments performed for each condition.

Figure 7 shows typical traces of K⁺-induced [Ca²⁺]_i responses in GT1-7 cell populations infused with muscimol or baclofen. Infusion of GT1-7 cell populations with the selective GABA_A-receptor agonist muscimol (10 μM) mimicked both of the effects elicited by GABA, that is, a rapid and transient stimulation of [Ca²⁺]_i, followed by the inhibition of [Ca²⁺]_i transients triggered by high concentrations of K⁺ (Fig. 7A). By contrast, the infusion of GT1-7 cell populations with the selective GABA_B-receptor agonist baclofen (100 μM) did not affect the amplitude of K⁺-triggered [Ca²⁺]_i transients nor induce any early deflection on the basal level of [Ca²⁺]_i (Fig. 7B).

Blockade of GABA Inhibition on K⁺-Induced [Ca²⁺]_i Transients by cAMP

Co-infusion of GT1-7 cell populations with GABA (10 μM), plus the direct-activator of adenylyl cyclase forskolin (20 μM), resulted in the blockade of the inhibitory response of GABA on the amplitude of K⁺-triggered [Ca²⁺]_i transients (Figs. 6 and 8A). The infusion of forskolin had no effect on the rapid stimulatory action of GABA on [Ca²⁺]_i (Fig. 8A). As shown in Figs. 6B and 8A, the amplitude of K⁺-induced [Ca²⁺]_i transients was not modified in 14 GT1-7 cell cultures coinfused simultaneously with GABA and forskolin. A similar result was obtained with the cAMP analog 8-Br-cAMP. Coinfusion of GT1-7 cell populations with 8-Br-cAMP (1 mM) prevented the inhibition of K⁺-triggered [Ca²⁺]_i transients induced by GABA (10 μM), while leaving the rapid and transient stimulatory action of GABA on [Ca²⁺]_i unaffected (Fig. 8B).

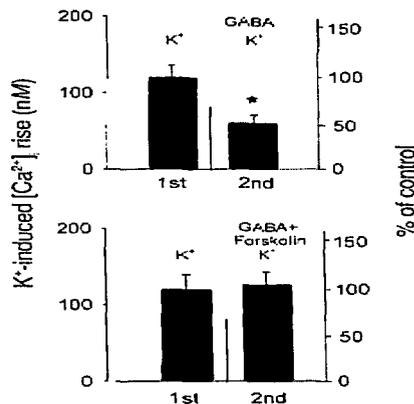


Fig. 6. Summary of the effects of GABA alone or in combination with forskolin on K⁺-evoked [Ca²⁺]_i rises in GT1-7 cells. GABA inhibited the [Ca²⁺]_i rises evoked by K⁺ to about 50% of control (A). Coadministration of forskolin (20 μM) reverted the effect of GABA (B). 1st, K⁺-evoked [Ca²⁺]_i rises before the administration of GABA or GABA plus forskolin; 2nd, K⁺-evoked [Ca²⁺]_i rises during GABA or GABA plus forskolin. **p* < 0.05 vs 1st value.

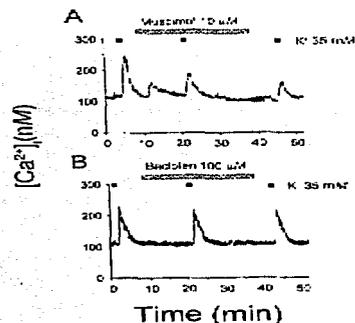


Fig. 7. Effect of muscimol or baclofen on K⁺-evoked [Ca²⁺]_i rises in GT1-7 cells. (A) Effect of administration of the GABA_A-receptor agonist muscimol (10 μM) on [Ca²⁺]_i transients evoked by 35 mM [K⁺]_i; (B) effect of administration of the GABA_B-receptor agonist baclofen (100 μM) on [Ca²⁺]_i transients evoked by 35 mM [K⁺]_i. Traces represent typical responses in five independent experiments performed for each condition.

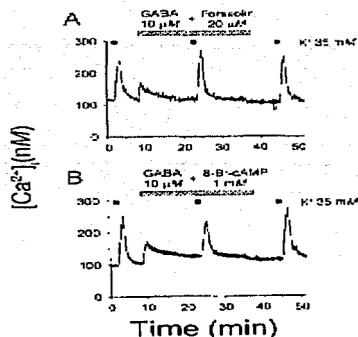


Fig. 8. Effect of GABA in combination with a cAMP analog or an activator of adenylyl cyclase on K^+ -evoked $[Ca^{2+}]_i$ rises in GT1-7 cells. (A) Effect of the combined administration of $10 \mu M$ GABA with $20 \mu M$ forskolin on $[Ca^{2+}]_i$ transients evoked by $35 mM$ $[K^+]_i$; (B) effect of the combined administration of $10 \mu M$ GABA with $1 mM$ 8-Br-cAMP on $[Ca^{2+}]_i$ transients evoked by $35 mM$ $[K^+]_i$. The traces represent typical responses obtained in 10 independent experiments performed for each condition.

Discussion

In the present study, with the use of fura-2 fluorometric recordings in monolayer networks of immortalized GnRH neurons of the GT1-7 lineage, we demonstrated that GABA inhibited neuronal excitability and that this effect was secondary to the inhibition of the adenylyl cyclase/cAMP pathway. Our results also show that both of these effects of GABA are triggered by the activation of GABA_A receptors.

GABA has the ability to stimulate a rapid and transient episode of GnRH secretion in GT1 neurons (20). This finding suggested that GT1 cells maintained elevated levels of intracellular chloride, which could be the result of a chloride intrusion mechanism, such as the one mediated by the sodium-potassium-2-chloride cotransporter (24,25), or the lack of an active chloride extrusion mechanism, such as the electroneutral potassium-chloride cotransporter (26, 27), or the inwardly rectifying chloride channel (28,29), all of which would result in a chloride reversal potential above the membrane potential. Consistent with this interpretation is the finding that GABA triggers the efflux of chloride ions, the depolarization of the membrane, and a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ (19,21,22). The level of expression of these chloride-intruding and -extruding molecules in GT1 cells remains to be determined.

The evanescent (lasting for only 10–15 min) increase in $[Ca^{2+}]_i$, observed here in the recorded population of immortalized GnRH neurons in response to GABA and muscimol, is consistent with previous reports in single GT1-7

cell recordings (19) and GT1-7 cell populations (30). It is possible that this initial $[Ca^{2+}]_i$ transient triggers the inhibition of adenylyl cyclase, leading to the decreased cell excitability observed 15 min after the onset of GABA infusion. The regulation of adenylyl cyclase by Ca^{2+} provides a confluence of two major signaling pathways with profound physiological significance. For instance, Ca^{2+} inhibition of adenylyl cyclase has been proposed to contribute to oscillations and pacemaking in cardiac tissue (31) and the maintenance of endothelial cell permeability (32). Calcium has been recognized as playing a critical regulatory role in modulating adenylyl cyclase activity, since two of the nine distinct mammalian adenylyl cyclases that have been cloned to date (31,33), namely types V and VI, are directly inhibited by submicromolar concentrations of calcium (31,34). Adenylyl cyclase type VI is widely expressed in the central nervous system (35). Moreover, the expression of adenylyl cyclase type V was recently reported in GT1-1 and GT1-7 cells (36), providing the basis for a putative GABA_A-triggered inotropic regulation of cAMP formation. In spite of this attractive possibility, the actual mechanism by which GABA_A receptors trigger the inhibition of adenylyl cyclase remains to be determined.

We previously reported that baclofen inhibited the amplitude of the pulsatile release of GnRH in GT1-1 cells, without affecting the basal levels of secretion (20). Expression of low levels of GABA_B receptors was previously shown by the binding of 3H -baclofen to synaptosomal membranes from GT1-7 cells (37). Because GABA_B receptors usually are negatively coupled to adenylyl cyclase, in this study we tested the effect of GABA on cAMP formation. Our results show a robust inhibitory effect of GABA on the accumulation of cAMP in GT1-7 cells that reached a minimum value 10 min after the onset of GABA and lasted for at least 30 min, without any sign of desensitization. These experiments were performed in the presence of an inhibitor of phosphodiesterases (IBMX), suggesting that GABA inhibited the synthesis of cAMP rather than increased the degradation of the cyclic nucleotide. The inhibitory effect of GABA on cAMP accumulation was blocked in a dose-dependent fashion by the antagonist bicuculline, suggesting that this effect was mediated by the activation of GABA_A receptors. This is consistent with the observation that the GABA_A-receptor agonist muscimol dose and time dependently decrease the intracellular content of cAMP in GT1-7 cells. GABA and muscimol also decrease the formation of cAMP in GT1-7 and GT1-1 cells, stimulated by dopamine, norepinephrine, and forskolin, suggesting a robust inhibitory effect of GABA_A receptors on the activity of adenylyl cyclase (unpublished observations).

However, baclofen did not affect the formation of cAMP, nor did it affect basal or K^+ -triggered $[Ca^{2+}]_i$ transients. Thus, in accordance with Hales et al. (19) and Spergel et al. (30), our present results show that GABA_B receptors are not coupled to calcium metabolism in GT1 cells. Altogether,

these observations suggest that the inhibitory effects of baclofen on pulsatile GnRH secretion reported in GT1-1 cells (20), on K⁺-triggered GnRH secretion in GT1-7 cells (37), on GnRH secretion from hypothalamic fragments (38), and on GnRH gene expression (39), do not involve the inhibition of the cAMP pathway nor the modulation of calcium signaling. Even though our study was not aimed at resolving this issue, the present results appear to be inconsistent also with an increased potassium conductance or a decreased calcium influx, the other actions attributed to GABA_A receptor stimulation (40). Thus, the nature of the signaling pathway coupling the effects of baclofen on GnRH neurons remains to be determined.

One of the interesting findings in our experiments is that activation of adenylyl cyclase can block the inhibitory action of GABA on K⁺-triggered [Ca²⁺]_i transients, suggesting that the inhibitory effect of GABA on GT1-7 cell excitability could be the consequence of decreased intracellular cAMP concentrations. Accordingly, blockade was also observed in cells treated with exogenous cAMP analogs. The elevation of cAMP levels in GT1 cells is clearly associated with cell depolarization and GnRH secretion. Increasing cAMP levels by administration of cAMP analogs, by activation of adenylyl-cyclase coupled receptors, and by direct activation of adenylyl cyclase, all result in facilitation of GnRH secretion (41–43). Although it is generally accepted that cAMP functions via activation of cAMP-dependent protein kinase (protein kinase A [PKA]), it is also known that cAMP has a direct effect on cellular function independent of PKA activation (44). GT1 cells were recently shown to express functional cyclic nucleotide-gated cation channels, suggesting that cAMP may have a direct effect on cellular excitability (36).

Taken together, our results suggest that the activation of GABA_A receptors on GT1-7-immortalized GnRH neurons, known to rapidly result in cell membrane depolarization and increased [Ca²⁺]_i, leads to a sustained inhibition of adenylyl cyclase. This action, in turn, provides a sustained inhibition of cellular excitability and, hence, could help explain the long-term, desensitization-resistant inhibition of pulsatile GnRH secretion by GABA. The role that these mechanisms identified in immortalized GnRH neurons may play in the regulation of reproduction by GABA through the direct modulation of GnRH neuronal physiology remains to be determined.

Materials and Methods

Reagents

Fura-2 AM, γ -amino-*n*-butyric acid, muscimol hydrobromide, (\pm)-baclofen, (–)-bicuculline methiodide, picrotoxin, forskolin, 8-Br-cAMP sodium, and IBMX were purchased from Research Biochemicals (Natick, MA). Adenosine 3', 5'-cyclic phosphoric acid 2'-*O*-succinyl-3 [1²⁵I]iodotyrosine methyl ester (2000 Ci/mmol) was purchased from Amersham (Little Chalfont, UK).

Cell Culture

The GT1-7 cell line (kindly provided by R. I. Weiner, University of California, San Francisco), was cultured in Dulbecco's modified eagle's medium supplemented with 10% of fetal bovine serum and penicillin/streptomycin. The cells were plated at a density of 2×10^5 cells/mL, directly on 24-well plates, or on 35-mm plastic Petri dishes containing 9×22 mm glass cover slips (Termanox, Miles, Naperville, IL) coated with poly-L-lysine. The cultures were maintained at 37°C in a water-saturated atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂. Cells were cultured until they reached 50–70% confluency, at which time medium was replaced by a defined medium (Opti-MEM; Gibco, Grand Island, NY) without serum for 2 d.

cAMP Studies

The GT1-7 cells were cultured with Opti-MEM supplemented with 1 mM IBMX for 90 min. Cells were then challenged with GABAergic drugs for the last 1–30 min. At the end of the incubation period, the cells were lysed in 1 mL of ice-cold 0.1N HCl and frozen on dry ice overnight. Then, lysates were sonicated and incubated at 4°C for 48 h. After centrifugation (10,000g for 30 min), the supernatants were stored at –20°C until radioimmunoassayed for cAMP.

cAMP Radioimmunoassay

cAMP from cell extracts was determined by radioimmunoassay, using rabbit anti-cAMP polyclonal antiserum AB505 (Chemicon, Temecula, CA), after acetylation of the samples with triethylamine-acetic anhydride (2:1). All samples from an experiment were analyzed in the same assay. The limit of detection was 10 fmol/mL and the intraassay coefficient of variation was 2.8%.

Measurement of [Ca²⁺]_i in Cell Populations

The cover slip-attached cultures were washed twice with Ringer's solution (140 mM NaCl; 2.8 mM KCl; 2.0 mM MgCl₂; 1.0 mM CaCl₂; 10 mM HEPES; and 10 mM glucose, pH 7.3), and the cells were then loaded with 2 μ M acetoxymethyl ester of the Ca²⁺-sensitive dye fura-2 (1 fura-2 AM), freshly dissolved in 10 μ L of dimethyl sulfoxide and then diluted in 30 mL of Ringer's solution) for 60 min. Then, fura-2 AM solution was removed by rinsing twice with Ringer's solution for 20 min at 37°C for completion of ester hydrolysis. The cover slips were suspended in a quartz cuvet so that the plane of the cover slip was at a 45° angle to the incident light and turned away from the emission monochromator so that reflected light would be minimal. Cells were continuously perfused with Ringer's solution and eventually replaced by Ringer's solution containing high K⁺ (35 mM; NaCl was isosmotically replaced by KCl), GABA, GABA agonists, GABA antagonists, forskolin, or 8-Br-cAMP. Determinations of [Ca²⁺]_i were made in a spectrophotometer (SLM-Aminco, Rochester, NY) equipped with a 150-W xenon lamp. The cells were alternately exposed to 340- and 380-nm light, and fluorescence

emission at 540 nm was collected, digitalized, and analyzed by the software provided with the spectrophotometer. Constants were determined for each cover slip using 5 μ M ionomycin for R_{max} at 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ and 5 mM EGTA for R_{min} . The ratio of the fluorescence excited at two wavelengths ($R = F_{540}/F_{480}$) was calibrated to express $[\text{Ca}^{2+}]_i$ using the formula proposed by Grynkiewicz et al. (45).

Data Analysis

The statistical significance of the results was tested by using a one-way analysis of variance followed by Fisher's multiple comparison test at 0.05 level of significance.

Acknowledgments

We are grateful to Gabriel Nava, Fernando López, and Pilar Galarza for their expert technical assistance. This work was supported in part by grant RGA-96-097 from The Third World Academy of Sciences.

References

- Karsch, F. J., Bowen, J. M., Caraty, A., Evans, N. P., and Moenter, S. M. (1997). *Biol. Reprod.* **56**, 303-309.
- Kordon, C., Drouva, S., Martínez de la Escalera, G., and Weiner, R. I. (1994). In: *The Physiology of Reproduction*, Knobil, E. and Neill, J. D. (eds.), Raven: New York, pp. 1621-1681.
- Jennes, L., Stumpf, W. E., and Tappez, M. L. (1983). *Exp. Brain Res.* **50**, 91-99.
- Leranth, C., MacLusky, N. J., Sakamoto, H., Shanabrough, M., and Nalofin, F. (1985). *Neuroendocrinology* **40**, 536-539.
- Petersen, S. L., McCrone, S., Coy, D., Adelman, J. P., and Mahan, L. C. (1993). *Endocr. J.* **1**, 29-34.
- Junig, H., Shannon, E. M., Frischy, J. M., and Ojeda, S. R. (1998). *Brain Res.* **780**, 218-229.
- Kusano, K., Fueshko, S., Gainer, H., and Wray, S. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3918-3922.
- Felder, C., Jarry, H., Leonhardt, S., Wuttke, W., and Moguilevsky, J. A. (1996). *Neuroendocrinology* **64**, 305-312.
- Jarry, H., Leonhardt, S., and Wuttke, W. (1990). *Neuroendocrinology* **51**, 337-344.
- Kimura, F., Sano, A., Hiiuma, H., and Funabashi, T. (1993). *Neuroendocrinology* **57**, 605-614.
- Funabashi, T., Innai, K., and Kimura, F. (1997). *NeuroReport* **8**, 771-774.
- Mitsushima, D., Hei, D. L., and Teresawa, E. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 395-399.
- Thind, K. K., and Goldsmith, P. C. (1995). *Neuroendocrinology* **61**, 471-485.
- Martínez de la Escalera, G., Choi, A. L. H., and Weiner, R. I. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1852-1855.
- Weisel, W. C., Valencu, M. M., Merchenthaler, I., Liposits, Z., López, F. J., Weiner, R. L., Mellon, P. L., and Negro-Vilar, A. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4149-4153.
- Krsmanovic, L. Z., Stojilkovic, S. S., Merelli, F., Dufour, S. M., Virmani, M. A., and Catt, K. J. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8462-8466.
- Bourguignon, J. P., Gerard, A., Debougnoux, G., Rose, J., and Franchimont, P. (1987). *Endocrinology* **121**, 993-999.
- Bourguignon, J. P., Gerard, A., Mathieu, J., Simons, J., and Franchimont, P. (1989). *Endocrinology* **125**, 1090-1096.
- Hales, T. G., Sanderson, M. J., and Charles, A. C. (1994). *Neuroendocrinology* **59**, 297-308.
- Martínez de la Escalera, G., Choi, A. L. H., and Weiner, R. I. (1994). *Neuroendocrinology* **59**, 420-425.
- Hales, T. G., Kim, H., Longoni, B., Olsen, R. W., and Tobin, A. J. (1992). *Mol. Pharmacol.* **42**, 197-202.
- Javors, M. A., King, T. S., Chang, X., Tiekou, M. K., and Levinson, C. (1998). *Brain Res.* **780**, 183-189.
- Sun, W., Jarry, H., Wuttke, W., and Kim, K. (1997). *Brain Res.* **747**, 70-77.
- Hoppe, D. and Kettenmann, H. (1989). *J. Neurosci. Res.* **23**, 467-475.
- LoTurco, J. J., Owens, D. F., Health, M. J. S., Davis, M. B. E., and Kriegstein, A. R. (1995). *Neuron* **15**, 1287-1298.
- Thompson, S. M., and Gahwiler, B. H. (1989). *J. Neurophysiol.* **61**, 512-522.
- Alvarez-Leefmans, F. J. (1990). In: *Chloride channels and carriers in nerve, muscle and glial cells*, Alvarez-Leefmans, F. J., and Russell, J. M. (eds.), Plenum: New York, pp. 109-158.
- Thiemann, A., Grunder, S., Pusch, M., and Jentsch, T. J. (1992). *Nature* **356**, 57-60.
- Jentsch, T. J., Günther, W., Pusch, M., and Schwappach, B. (1995). *J. Physiol.* **482**, 19s-25s.
- Spergel, D. J., Krsmanovic, L. Z., Stojilkovic, S. S., and Catt, K. J. (1995). *Neuroendocrinology* **61**, 499-508.
- Cooper, D. M. F., Karpen, J. W., and Mons, N. (1995). *Nature* **374**, 421-424.
- Stevens, T., Nakahashi, Y., Cornfield, D., McMurtry, I. F., Cooper, D. M. F., and Rodman, D. M. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2696-2700.
- Taussig, R., and Gilman, A. G. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 1-4.
- Guillou, J.-L., Nakata, H., and Cooper, D. M. F. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 35539-35545.
- Liu, F. C., Wu, G. C., Hsieh, S. T., Lai, H. L., Wang, H. F., Wang, T. W., and Chern, Y. (1998). *FEBS Lett.* **436**, 92-98.
- Vitalis, E. A., Constant, J. L., Tsai, P. S., Sakakibara, H., Paruthiyil, S., Iiri, T., Marini, J. F., Taga, M., Choi, A. L. H., Charley, A. C., and Weiner, R. I. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1861-1866.
- Favit, A., Wetsel, W. C., and Negro-Vilar, A. (1995). *Endocrinology* **133**, 1983-1989.
- Donoso, A. O., López, F. J., and Negro-Vilar, A. (1992). *Endocrinology* **131**, 1559-1561.
- Bergen, H. T., Hejtmancik, J. F., and Pfaff, D. W. (1991). *Exp. Brain Res.* **87**, 46-56.
- Misgeld, U., Bjak, M., and Jarolimek, W. (1995). *Prog. Neurobiol.* **46**, 423-462.
- Martínez de la Escalera, G., Choi, A. L. H., and Weiner, R. I. (1992). *Endocrinology* **131**, 1397-1402.
- Martínez de la Escalera, G., Gallo, F., Choi, A. L. H., and Weiner, R. I. (1992). *Endocrinology* **131**, 2965-2971.
- Martínez de la Escalera, G., Choi, A. L. H., and Weiner, R. I. (1995). *Neuroendocrinology* **61**, 310-317.
- Du, X. Y., and Sorota, S. (1997). *J. Physiol. (Lond.)* **500**, 111-122.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN