

---

## Participación de los receptores GABAB en la regulación del eje gonadotrófico: evaluación en ratones $GABA_{B1}^{-/-}$

Dr. Paolo N. Catalano<sup>1</sup>, Lic. María Marta Bonaventura<sup>1</sup>, Lic. Noelia Di Giorgio<sup>1</sup>,  
Dr. Carlos Libertun<sup>1,2</sup>, Dra. Victoria A. Lux-Lantos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Vuelta de Obligado 2490 C1428ADN  
Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155 C1121ABG  
Buenos Aires, Argentina

Dr. Victoria Lux-Lantos - Vuelta de Obligado 2490, (C1428ADN) Buenos Aires, Argentina.  
TE: 54 11 4783 2869 - Fax : 54 11 4786-2564 - e-mail: vlux@dna.uba.ar

### Resumen

Hasta el momento, los estudios realizados sobre la participación de los receptores GABAB (RGABAB) en la regulación neuroendocrina habían sido llevados a cabo a través de abordajes farmacológicos, mediante la utilización de agonistas y antagonistas específicos. En el presente trabajo utilizamos el modelo de ratón  $GABA_{B1}^{-/-}$  para analizar las consecuencias endocrinas de la falta constitutiva de los RGABAB en la unidad hipotálamo-hipófiso-gonadal.

No observamos diferencias en los contenidos hipofisarios ni en los niveles séricos de LH y FSH entre los genotipos en ningún sexo. Sin embargo, nuestros estudios in vitro, demostraron la existencia de alteraciones de la fisiología de los gonadotropos provenientes de hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$ , con una secreción basal aumentada de gonadotropinas y una menor respuesta al estímulo con GnRH. Al analizar más específicamente la funcionalidad del eje en estos ratones, encontramos alteraciones en el aumento de LH postcastración en las hembras, confirmando la participación de los RGABAB en este fenómeno.

Por otro lado, en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  adultas demostramos la presencia de alteraciones en el contenido hipotalámico de GnRH, el cual estaba francamente disminuido, y su secreción pulsátil, en la que se observa un aumento significativo de la frecuencia de los pulsos de GnRH. También observamos un aumento

en los contenidos hipotalámicos de neurotransmisores aminoacídicos (GABA y glutamato) que podrían afectar la liberación de GnRH.

Por otro lado, determinamos que las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  presentaron alteraciones en la ciclicidad, con bajo porcentaje de proestros y presencia de prolongados estros. Además, su función reproductiva se vio claramente afectada, mostrando un menor índice de preñez y una marcada disminución de preñeces exitosas.

Todas las alteraciones que observamos a diferentes niveles del eje gonadotrófico en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$ , destacando especialmente las alteraciones en la secreción de GnRH, probablemente determinen las alteraciones demostradas en la ciclicidad y fertilidad de estos animales.

El presente estudio confirma la importante participación de los RGABAB en la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, y podría ayudar a esclarecer desórdenes endocrinos y reproductivos que pueden aparecer en patologías en las que los RGABAB podrían estar involucrados, como son la epilepsia, la espasticidad, la ansiedad, la depresión y la adicción.

### Summary

Studies undertaken to reveal the participation of GABAB receptors on neuroendocrine regulation had

been performed by pharmacological approaches, using specific agonists or antagonists of the GABAB receptor. In this work we used the GABA<sub>B1</sub><sup>-/-</sup> mouse model to analyze the endocrine consequences of the constitutive lack of functional GABAB receptors on hypothalamic-pituitary-gonadal physiology.

Pituitary gonadotropin content as well as LH and FSH serum levels did not differ between wild-type mice and GABA<sub>B1</sub><sup>-/-</sup> in either sex. Nevertheless, our in vitro studies showed physiologic alterations in gonadotropes from adult female GABA<sub>B1</sub><sup>-/-</sup> mice, showing increased basal secretion and impaired response to GnRH. When further analyzing the physiology of the gonadotropin axis in these mice, we observed an altered increase in post-gonadectomy LH rise in GABA<sub>B1</sub><sup>-/-</sup> females, confirming the participation of GABAB receptors in this event.

In addition, we demonstrated that adult GABA<sub>B1</sub><sup>-/-</sup> females had decreased hypothalamic GnRH contents and an increased frequency in GnRH pulsatile secretion. Increases in hypothalamic amino acidic neurotransmitters (GABA and glutamate) contents were also observed in GABA<sub>B1</sub><sup>-/-</sup> females, which could affect GnRH secretion.

We also showed that GABA<sub>B1</sub><sup>-/-</sup> females had altered estrous cycles with a decrease of the number of days in proestrus and an increase of the days in estrus. Moreover, their reproductive function was significantly affected, showing a decreased pregnancy index and a decrease in successful pregnancies.

All the alterations at different levels of the gonadotropic axis observed in GABA<sub>B1</sub><sup>-/-</sup> females, determine the abnormal estrous cycles and pregnancies, probably being GnRH pulsatility the most important factor.

The present study confirms the participation of GABAB receptors in the regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and could help to elucidate endocrine and reproductive disorders that are present in pathologies involving compromise of GABAB receptors such as epilepsy, anxiety, depression and addiction.

## Introducción

### Ácido gamma amino butírico

El ácido gamma amino butírico, GABA, es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro. Es sintetizado por el 20-30 % de las neuronas del sistema nervioso central y participa en el 40% del procesamiento sináptico inhibitorio. Es indispensable para el control de muy variadas funciones como la actividad locomotora, el aprendizaje y los ritmos circadianos, entre otros<sup>1,2</sup>. La síntesis de GABA es catalizada por la enzima ácido glutámico decarboxilasa (GAD), y este neurotransmisor es catabolizado por la GABA transaminasa. GABA y GAD

se encuentran también en otros tejidos como hipófisis, ovarios, trompas de Falopio, testículos, glándulas adrenales, riñones y células beta del páncreas<sup>3</sup>. La función precisa del GABA en algunos de estos tejidos y órganos es aún poco conocida, pero se sabe que GABA actúa también como neurohormona, molécula de señalización paracrina, metabolito intermedio y factor trófico<sup>1,4,5</sup>. Los primeros estudios sobre los efectos de GABA sobre la secreción hormonal arrojaron resultados controvertidos, tanto estimulatorios como inhibitorios sobre, por ejemplo, PRL y LH<sup>6-8</sup>. En estos estudios se lo postuló como un regulador neuroendocrino<sup>6,9-11</sup> aún antes de que sus receptores fueran caracterizados.

### Receptores para GABA

El primer receptor GABA en ser caracterizado fue el GABAA. Éste es un receptor ionotrópico, formado por cinco subunidades, que forma un canal de cloruro, asociado a conductancias inhibitorias rápidas<sup>1,12,13</sup>. Los receptores GABAC, los últimos en ser descritos, son un subtipo de los receptores GABAA<sup>14</sup>. En 1980 Bowery y col. introdujeron por primera vez el concepto de un segundo receptor para GABA, que se diferenciaba farmacológicamente del GABAA, siendo selectivamente activado por el baclofen ( $\beta$  p-clorofenil GABA)<sup>15</sup>. Este receptor era de tipo metabotrópico, ligado a proteínas G<sub>i/o</sub> y sensible a toxina de Pertussis. Al activarse el receptor GABAB se induce una hiperpolarización lenta y tardía, con atenuación de la conductancia de la membrana al calcio e incremento de la conductancia al potasio, observándose también inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa<sup>16</sup>. Todas estas características fueron descubiertas mucho antes de que se conociera la estructura molecular del receptor. Es más, el baclofen ya era de uso clínico para el tratamiento de la espasticidad y otros trastornos neurológicos, sin conocerse su mecanismo de acción o si su uso podría acarrear efectos secundarios, por ejemplo sobre el sistema endocrino<sup>17-19</sup>.

### GABA y regulación de la secreción de gonadotropinas

La participación del GABA en la regulación del eje reproductivo y en la secreción de gonadotropinas es compleja, dado que éste puede actuar en los tres niveles de regulación (SNC, hipófisis y gónadas) y a través de sus dos tipos de receptores, GABAA y GABAB. Esto origina una variedad de respuestas *in vivo*, estimulatorias o inhibitorias, que dependen del estado fisiológico, endocrino o madurativo del animal<sup>20-28</sup>.

Se ha observado un efecto dual del GABA sobre la secreción de gonadotropinas dependiendo del modelo en estudio. Por un lado, este neurotransmisor inhibe tanto la secreción pulsátil como el pico de LH inducido por esteroides en animales enteros<sup>29,30</sup>. Este efecto se debería a una acción a nivel central, en el cual estarían

involucrados los receptores GABAA y GABAB. Se ha postulado que las neuronas GABAérgicas modulan indirectamente la secreción de GnRH, y por ende de LH, al regular neuronas estimuladoras y/o inhibitorias de la actividad de las neuronas GnRH a través de los receptores GABAA y GABAB<sup>31</sup>. Se demostró que GABA inhibe a las neuronas noradrenérgicas ubicadas en el hipotálamo, implicadas en la regulación positiva de la secreción de GnRH<sup>22,30</sup>. Pero, dada la existencia de una inervación directa de las neuronas GABAérgicas sobre las neuronas GnRH<sup>32</sup> y la presencia de receptores GABAA y GABAB en dichas neuronas<sup>33-35</sup>, no se puede descartar una acción directa del GABA sobre la liberación de este decapeptido<sup>32</sup>. Además, en cuanto al rol excitatorio del GABA y de agonistas GABAA sobre la liberación de GnRH, este efecto se ha observado tanto en estudios *in vitro*, con fragmentos de eminencia media y cortes de hipotálamo,<sup>21,36,37</sup> como *in vivo*, en los cuales se administró GABA en la vecindad de la eminencia media<sup>38</sup>. También se demostró que el sistema GABAérgico en ratas hembras estimula la secreción de GnRH y LH durante el período prepuberal temprano, y tiene una acción inhibitoria sobre este eje en el período prepuberal tardío y en la adultez<sup>39</sup>. Otros autores postulan que el GABA tendría un efecto estimulador sobre las neuronas GnRH a través de sus receptores GABAA también en el adulto, dado que estas neuronas conservarían los canales iónicos típicos del estado inmaduro<sup>40-42</sup>.

Respecto de los RGABAB, más específicamente los autores Akema y Kimura, propusieron que éstos estarían involucrados en la respuesta de LH a los estrógenos en ratas hembras castradas<sup>25</sup>. Además, otros autores atribuyeron las diferencias sexuales en el aumento de gonadotropinas postcastración a los RGABAB, junto a los receptores GABAA<sup>43,44</sup>.

Es interesante mencionar además que las neuronas GnRH son el tipo celular crítico, involucrado en la inducción de la pubertad en los mamíferos. Resulta esencial para ello la activación sincronizada y en fase de dichas neuronas, con un aumento en la amplitud y frecuencia de la pulsatilidad de GnRH desde el hipotálamo, lo que resulta en un aumento de la síntesis y liberación de gonadotropinas y esteroides gonadales, seguido por la aparición de los caracteres sexuales secundarios. Sin embargo, los mecanismos que desencadenan la activación de estas neuronas en esta etapa del desarrollo, aún no están claros. Se ha postulado que el GABA está involucrado en el despertar peripuberal del eje hipotalámico-hipofiso-ovárico<sup>39</sup>. En la rata, se demostró que el aumento de la liberación de GnRH en este periodo es desencadenado por una disminución en la síntesis de GABA debida a cambios en la síntesis de GAD-67, y una reducción de la liberación de GABA en la zona del tallo-eminencia me-

dia; se observa también un aumento en la liberación de glutamato en esta misma zona<sup>45</sup>. En primates también se demostró que cambios en la síntesis de GAD podrían ser críticos en la eclosión puberal<sup>46</sup>. Por otro lado, el pasaje de un efecto despolarizador a hiperpolarizador ejercido por el GABA a través del receptor GABAA en las neuronas GnRH, pareciera estar demorado hasta el momento de la pubertad. Algunas observaciones sugieren que el desarrollo de las neuronas GnRH exhibe una secuencia de señalización que transita primero por el GABA y luego al glutamato tal como ocurre en otras redes neuronales, que sólo se ve completada al momento de la eclosión puberal<sup>47</sup>. Poco se sabe de la posible participación de los RGABAB en la eclosión puberal.

Al analizar las acciones directas del GABA sobre la secreción hipofisaria, se demostró un efecto estimulador sobre la liberación de LH y FSH en la hipófisis anterior a través de los receptores GABAA<sup>48-50</sup>. A su vez, trabajos de nuestro laboratorio demostraron que el GABA, a través de los RGABAB, puede disminuir la secreción de LH y FSH estimulada por GnRH en cultivos de células adenohipofisarias de ratas en proestro y de ratas hembras de 12 días de edad<sup>51,52</sup>. También demostramos que la activación del RGABAB hipofisario producía similares efectos intracelulares que los observados en SNC, como acoplamiento a proteínas  $G_{i/o}$ , inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje e inhibición de la adenilil ciclasa<sup>53</sup>.

#### GABA en las gónadas

Además de la acción a nivel central e hipofisario, el GABA también ejercería acciones en las gónadas *per se*. Se demostró que los testículos expresan GAD<sup>54,55</sup>, receptores GABAA y GABAB<sup>55-57</sup>, así como también transportadores para GABA<sup>55,58</sup>. Se propuso un rol fisiológico para el GABA en el control de la proliferación de las células de Leydig y en la síntesis de esteroides<sup>55,59</sup>. Los receptores GABAB también se expresan en el ovario<sup>60-62</sup>, y se postula que el GABA ejercería un posible efecto sobre la esteroidogénesis también en las gónadas femeninas<sup>63</sup>.

#### Modelo de estudio: ratones $GABA_{B1}^{-/-}$

En el año 2001, el Dr. B. Bettler y col. generaron ratones de la cepa BALB/C que carecen de la expresión de la subunidad RGABAB1 ( $GABA_{B1}^{-/-}$ ), careciendo en consecuencia de la expresión de un RGABAB funcional. Como consecuencia de la falta de expresión de RGABAB funcionales, estos animales sufren de ataques epilépticos espontáneos, hiperalgesia, hiperlocomotividad y trastornos de la memoria<sup>64</sup>. Agradecemos al Dr. B. Bettler la donación de las primeras parejas de ratones  $GABA_{B1}^{+/+}$  para establecer la colonia en el IBYME. A partir de allí comenzamos la caracterización de estos

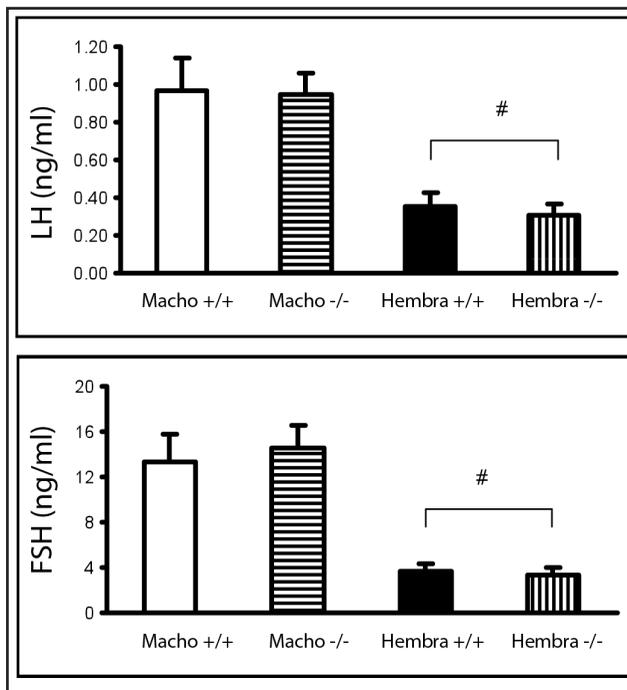
animales desde un punto de vista endocrino, tema que aún no había sido estudiado.

### Evaluación de la fisiología del eje gonadotrófico en los ratones $GABA_{B1}^{-/-}$

Hasta ahora, todos los estudios sobre la participación de los RGABAB en la regulación neuroendocrina, habían sido llevados a cabo a través de abordajes farmacológicos mediante la utilización de agonistas y antagonistas específicos. Dada la importancia del GABA en la regulación del eje gonadotrófico y la propuesta participación de los RGABAB en varios niveles de regulación, nos propusimos estudiar la fisiología del eje gonadotrófico en los ratones  $GABA_{B1}^{-/-}$ , centrándonos principalmente en la hembras adultas.

#### Evaluación de los niveles de gonadotropinas en ratones $GABA_{B1}^{-/-}$ y salvajes

Primero evaluamos los niveles basales de gonadotropinas en ambos sexos y genotipos en animales adultos. Para evitar variaciones por el ciclo estral, las hembras fueron evaluadas en estro (Figura 1). No se observaron diferencias genotípicas en los niveles séricos basales de gonadotropinas, sólo las diferencias sexuales esperadas. También evaluamos el contenido hipofisario de LH y FSH, siendo su patrón muy similar al observado en suero (no se muestra).



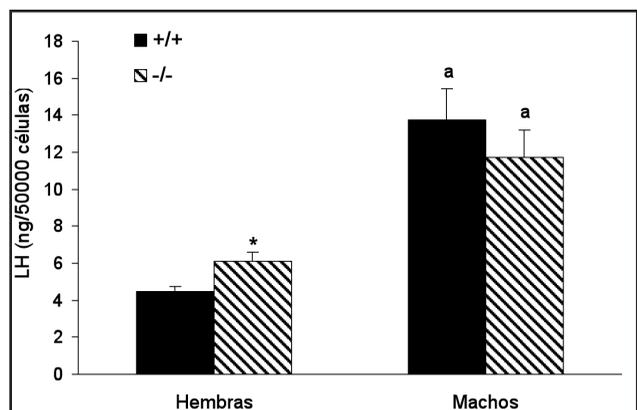
**Figura 1:** Niveles séricos basales del LH y FSH en machos y hembras adultos de ambos genotipos. #: Significativamente diferente de machos.

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si a nivel hipofisario *per se*, la ausencia de expresión de un RGABAB funcional podría producir alteraciones en la secreción de las gonadotropinas. Los cultivos primarios de células adenohipofisarias nos permiten evaluar la secreción de estas células sin la presencia de los estímulos, positivos o negativos, que les llegan desde el entorno (GnRH, neurotransmisores, hormonas esteroideas, inhibina, etc) y, por lo tanto, determinar si existen alteraciones en ellas por la ausencia local de la expresión de un receptor funcional.

Las células hipofisarias provenientes de los machos salvajes, presentaron una secreción basal de LH al medio de cultivo significativamente mayor que la de las hembras salvajes (Figura 2), en concordancia con los mayores niveles séricos y el mayor contenido hipofisario de LH observado en machos. Las células hipofisarias provenientes de los machos  $GABA_{B1}^{-/-}$  presentaron una secreción basal de LH similar a las células provenientes de sus pares salvajes.

En cambio, las células de las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  mostraron una secreción basal de LH mayor respecto a las hembras salvajes, pero significativamente menor que la de las células de machos salvajes o  $GABA_{B1}^{-/-}$ , manteniéndose así el dimorfismo sexual observado *in vivo*.

En cuanto a la secreción de FSH, las células hipofisarias provenientes de los machos salvajes presentaron una secreción basal significativamente menor que las de las hembras salvajes (Figura 3), a pesar de que el contenido hipofisario de FSH es mayor en los machos. Las células hipofisarias de los machos  $GABA_{B1}^{-/-}$  mostraron una secreción basal de FSH similar a las de los machos salvajes, mientras que las células de las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  mostraron una secreción aumentada de FSH

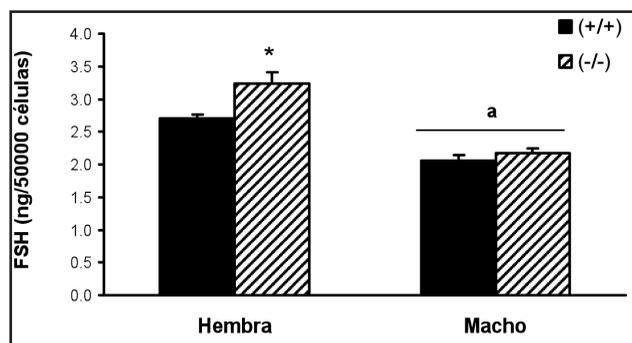


**Figura 2.** Niveles de LH secretados al medio de cultivo por células adenohipofisarias provenientes de hembras y machos adultos de ambos genotipos, en condiciones basales. ANOVA de 2 factores, factores: sexo y genotipo: interacción:  $p < 0,01$ , \*: significativamente diferente de machos salvajes y  $GABA_{B1}^{-/-}$  y de hembras  $GABA_{B1}^{+/+}$ . a: significativamente diferente de hembras para cada genotipo.

en comparación con las hembras salvajes, similar a lo observado para LH.

En el caso de FSH, las diferencias sexuales observadas por secreción de las células *in vitro* (niveles en hembras mayores que en machos) son opuestas a las observadas *in vivo*, tanto respecto del contenido como de los niveles séricos de FSH, demostrando que las diferencias observadas *in vivo* son consecuencia de un riguroso control por parte de inhibina y estradiol sobre la secreción de FSH en las hembras, y que no es una característica de los gonadotropos secretores de FSH. Es más, se sabe que la inhibina ejerce un fuerte control inhibitorio sobre la secreción de FSH en los machos desde los 5 días de edad, y que este control se va perdiendo hacia la adultez. Contrariamente a esto, en las hembras el control inhibitorio de la inhibina sólo aparece a partir del día 20 en los roedores hembras, y es muy eficiente en la hembra adulta<sup>65,66</sup>.

Las diferencias observadas en la secreción basal de gonadotropinas entre las hembras salvajes y las  $GABA_{B1}^{-/-}$  nos sugieren que existiría una regulación negativa dada por GABA a través de los RGABAB en el gonadotropo salvaje, y que, por otro lado, en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  *in vivo*, esta falta de regulación directa sobre el gonadotropo estaría enmascarada por la presencia de los mecanismos clásicos de retroalimentación. En la situación *in vitro*, el GABA presente en la hipófisis para ejercer esta regulación sería posiblemente de origen paracrina, ya que se ha demostrado que los somatotropos sintetizan GABA, dado que expresan su enzima de síntesis, GAD<sup>67</sup>. La secreción basal aumentada de ambas gonadotropinas demostrada en las células hipofisarias de las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  adultas, estaría de acuerdo con nuestros resultados previos, demostrando que existen RGABAB activos, sensibles a toxina de Pertussis, acoplados a canales de calcio en las células hipofisarias<sup>53</sup>.



**Figura 3:** Niveles de FSH secretados al medio de cultivo por células adenohipofisarias provenientes de hembras y machos adultos de ambos genotipos, en condiciones basales. ANOVA de 2 factores, factores: sexo y genotipo: interacción: ns, efecto principal sexo: a:  $p < 0,001$ , efecto principal genotipo:  $p < 0,02$ , diferencia entre hembras salvajes y  $GABA_{B1}^{-/-}$  por comparaciones planeadas, \*:  $p < 0,02$ .

Por otro lado, cuando estimulamos con GnRH las células adenohipofisarias en cultivo, observamos un aumento en la secreción de LH en ambos sexos y ambos genotipos. GnRH indujo un aumento significativo de FSH en machos de ambos genotipos y en hembras salvajes, no así en hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  (no se muestra).

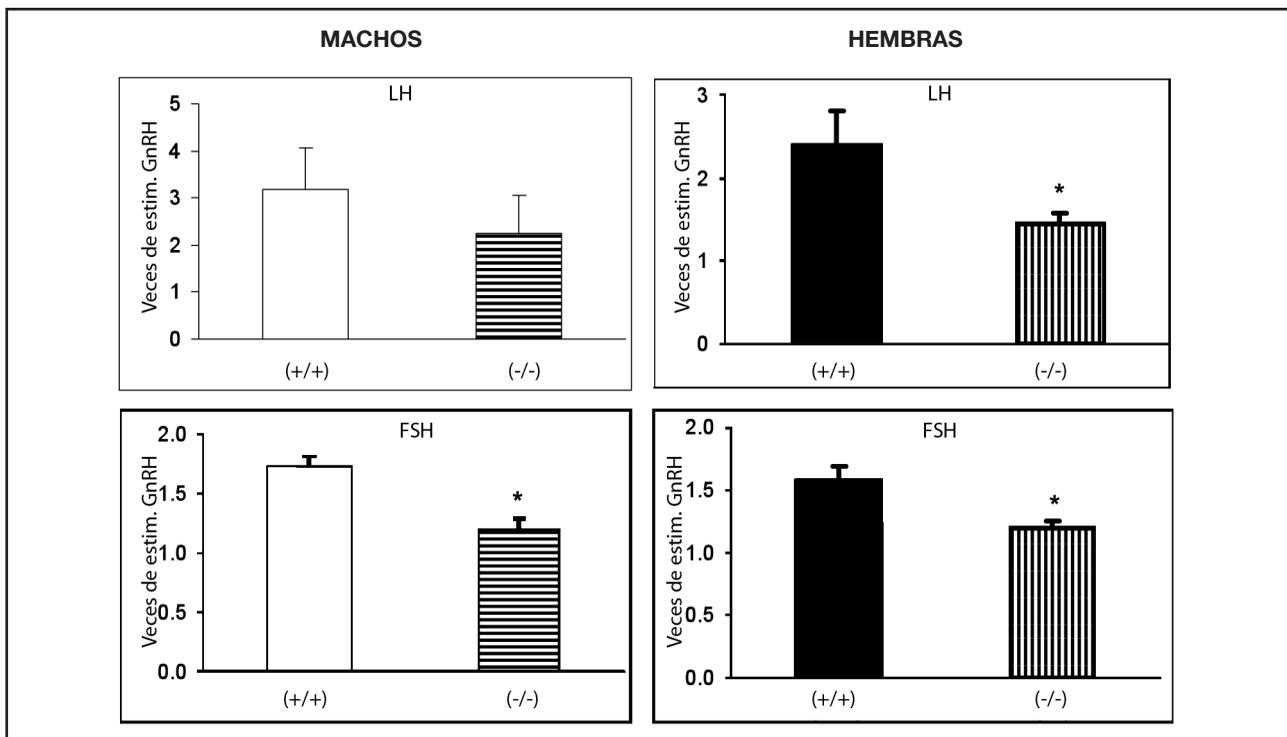
Además, la capacidad de estimular la secreción de las gonadotropinas (calculada como veces de secreción por encima del basal para cada grupo), fue menor en los animales  $GABA_{B1}^{-/-}$ , principalmente en las hembras (Figura 4).

La menor sensibilidad al GnRH podría explicarse por una posible disminución de la cantidad de gránulos secretorios disponibles para responder frente a la estimulación con el decapeptido, debido a la secreción basal aumentada de gonadotropinas, como ya se sugirió en otras situaciones similares, donde un aumento de la secreción basal de PRL se acompañaba de una menor respuesta a angiotensina II o TRH<sup>68</sup>.

Estos resultados demuestran que la falta de RGABAB funcionales en la hipófisis, altera la fisiología del gonadotropo, en mayor medida en las hembras que en los machos, y que esto se puso de manifiesto en la situación *in vitro*.

Dado que se había propuesto que los RGABAB estarían involucrados en la respuesta de LH a los estrógenos en ratas hembras castradas, y que se les atribuyeron las diferencias sexuales en el aumento de gonadotropinas post-castración, junto a los RGABAA, se evaluaron los niveles de gonadotropinas luego de la castración y reemplazo hormonal con estradiol, y también durante el desarrollo de la hipergonadotropinemia post-castración.

En un clásico experimento de castración y posterior terapia de reemplazo, determinamos los niveles de LH y FSH sérica en condiciones basales y a los 7 días post-ovariectomía, realizando en un grupo terapia de reemplazo con estradiol (cápsulas de Silastic® conteniendo 2,5 µg de 17β-estradiol). No se encontraron diferencias entre los genotipos en los niveles séricos basales de LH como de FSH, ni en los altos niveles de gonadotropinas alcanzados luego de la gonadectomía a estos tiempos. La administración de estrógenos fue igualmente eficaz en inhibir la hipergonadotropinemia en hembras de ambos genotipos (no se muestran). El hecho de que no hayamos observado diferencias en la acción de retroalimentación negativa del estradiol sobre los niveles de gonadotropinas inducidas por la castración entre los genotipos a este tiempo, está de acuerdo con la hipótesis planteada por un grupo de investigadores, que sugiere que los RGABAB se encuentran inactivados durante la retroalimentación negativa del estradiol<sup>28</sup>. En esta situación, la acción inhibitoria de GABA es ejercida probablemente a través de los receptores GABAA y, por lo



**Figura 4.** Incrementos en la secreción de LH y FSH, con respecto a los niveles basales, por la estimulación con GnRH en células adenohipofisarias provenientes de hembras y machos adultos de ambos genotipos.\*: significativamente diferente de ratones salvajes.

tanto, debe ser similar entre las hembras salvajes y las  $GABA_{B1}^{-/-}$ . De acuerdo con esta hipótesis, en estudios previos demostramos que el estradiol disminuye la expresión y/o la sensibilidad de los RGABAB, tanto en el hipotálamo como en la hipófisis de rata<sup>69</sup>.

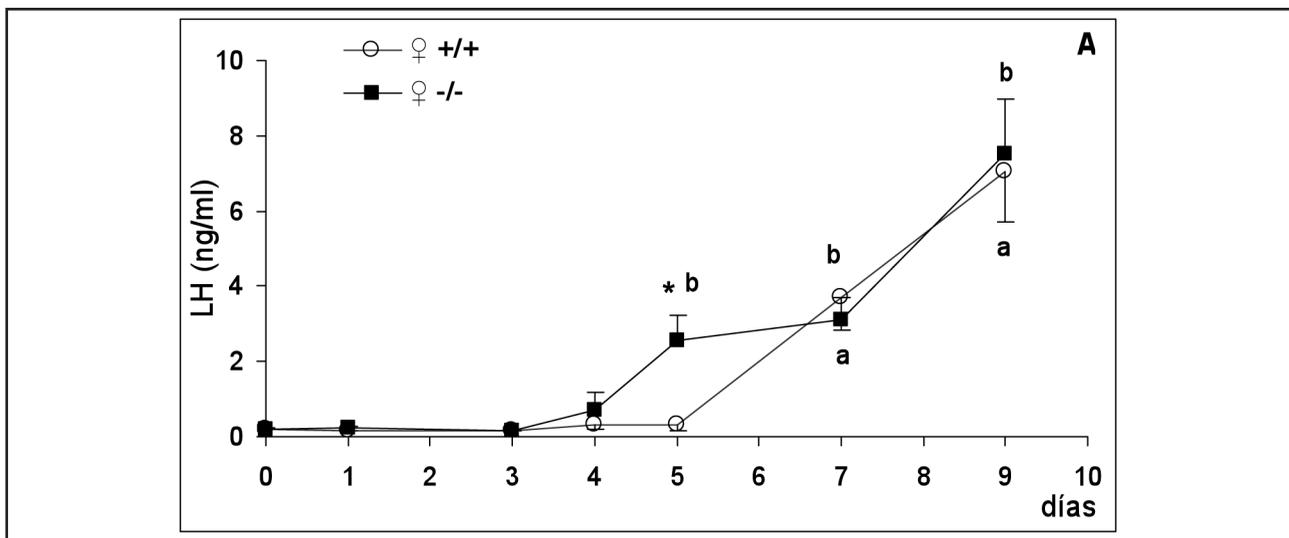
Como mencionáramos, algunos trabajos de la literatura sugerían que el GABA, mediante la activación de los RGABAA y RGABAB, participaría activamente en el retraso del aumento de LH post-castración en ratas hembras pero no así en machos<sup>70</sup>. Para verificar si existía una respuesta semejante en ratones, y si en ésta también participaban los RGABAB, evaluamos el incremento de gonadotropinas en ratones de ambos sexos y ambos genotipos durante los primeros 9 días post-castración.

Demostramos que en los ratones salvajes ocurre el mismo dimorfismo sexual en respuesta a la gonadectomía que el observado en ratas. En los machos, los niveles séricos de ambas gonadotropinas aumentaron marcadamente a las 24 horas post-castración, sin diferencias significativas entre los genotipos (no se muestra). En las hembras salvajes, los niveles séricos de LH sólo aumentaron significativamente a partir del día 7 post-castración (Figura 5), lo que resulta similar a lo descrito en la rata<sup>70</sup>.

Llamativamente, se observó una diferencia en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  respecto de esta respuesta, dado que los niveles de LH ya aumentaron marcadamente en

el día 5 post-castración, alcanzando niveles 4 veces más altos que en el día 4 post-castración, y 8 veces más altos que los niveles de las hembras salvajes en ese mismo día. Los niveles de LH alcanzaron niveles similares en hembras de ambos genotipos en el día 7 post-castración, en concordancia con lo observado en el experimento de castración y reemplazo hormonal arriba descrito. Estas observaciones fueron específicas para LH, ya que los niveles de FSH aumentaron de modo similar en las hembras de ambos genotipos desde el primer día post-castración, aunque más gradualmente que en los machos (no se muestra).

Por lo tanto, los RGABAB tendrían un rol significativo en el mantenimiento transitorio de los bajos niveles de LH en hembras ovariectomizadas. Se describió que en la rata, hay un aumento en el contenido hipotalámico de GABA post-castración en las hembras y una disminución en los machos<sup>71</sup>, justificando así la inhibición de la liberación de GnRH y LH en hembras y el aumento inmediato de estos parámetros en los machos. Este efecto del GABA fue revertido por antagonistas GABAA y GABAB en hembras, sugiriendo la participación de ambos tipos de receptores<sup>70</sup>. El temprano aumento de los niveles de LH en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  ovariectomizadas, corrobora la participación de los RGABAB en esta respuesta en el ratón, y demuestra que, en ausencia de estradiol, los RGABAB están activos en el control de



**Figura 5.** Niveles séricos de LH postcastración en hembras adultas de ambos genotipos a lo largo de 9 días post-gonadectomía. a: significativamente diferente de los niveles iniciales de hembras salvajes, b: significativamente diferente de los niveles iniciales de hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$ , \*: significativamente diferente de hembras salvajes ese día.

la secreción de LH en la hembra salvaje ovariectomizada, como se sugirió previamente en la rata<sup>72</sup>. Un efecto adicional a través de los receptores GABA<sub>A</sub> es ejercido probablemente en la supresión inicial del aumento de LH en hembras, ya que en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$ , los niveles de LH no aumentaron tan tempranamente como en los machos, aunque no se descartan otros factores que pudieran intervenir. La falta de diferencias en los niveles de FSH entre las hembras de ambos genotipos, muestra que esta hormona es menos dependiente de la estimulación por GnRH, y que está sujeta a un fuerte control inhibitorio ejercido por la inhibina y los estrógenos, inhibición que se pierde con la castración.

#### Evaluación de los niveles de GnRH y neurotransmisores relacionados en ratones $GABA_{B1}^{-/-}$ y salvajes

Continuando con la evaluación del eje gonadotrófico, también determinamos los contenidos de GnRH en los hipotálamos de ambos sexos y genotipos, observando que los machos poseen contenidos superiores a las hembras, sin diferencias entre los genotipos. Las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$ , en cambio, muestran niveles significativamente inferiores a los de las hembras salvaje (Tabla 1). Por otro lado, dos neurotransmisores críticamente involucrados en el control de la secreción de GnRH, GABA y glutamato, inhibitorio y excitatorio respectivamente, se encontraban aumentados en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  respecto de las salvajes (Tabla 1), sin observarse diferencias entre los machos.

**Tabla 1:** Contenidos de GnRH, GABA y glutamato en hipotálamo de ratones machos y hembras,  $GABA_{B1}^{-/-}$  y salvajes

	GnRH (pg/mg tejido)	GABA (nmoles/mg tejido)	Glutamato (pg/mg tejido)
♂ (+/+)	98.0 ± 18.9 <sup>a</sup> (12)	9.44 ± 0.40 (12)	15.08 ± 0.86 (12)
♂ (-/-)	63.1 ± 8.7 <sup>a</sup> (12)	9.85 ± 0.43 (12)	14.49 ± 0.65 (12)
♀ (+/+)	67.0 ± 11.8 (5)	6.60 ± 0.43 <sup>*</sup> (5)	10.93 ± 0.75 <sup>*</sup> (6)
♀ (-/-)	25.2 ± 7.3 <sup>b</sup> (5)	8.99 ± 0.43 (6)	13.20 ± 0.64 (6)

**GnRH:** ANOVA en dos sentidos, interacción no significativa, efecto principal sexo:  $p < 0.05$ , a: distinto de hembras, efecto principal genotipo:  $p < 0.05$ , b: distinto de hembras +/+ por comparaciones planeadas. **GABA:** ANOVA en dos sentidos, interacción:  $p < 0.02$ , \*:  $p < 0.01$ , significativamente diferente de todos. **Glutamato:** ANOVA en dos sentidos, interacción:  $p < 0.05$ , \*:  $p < 0.01$ , significativamente diferente de todos.

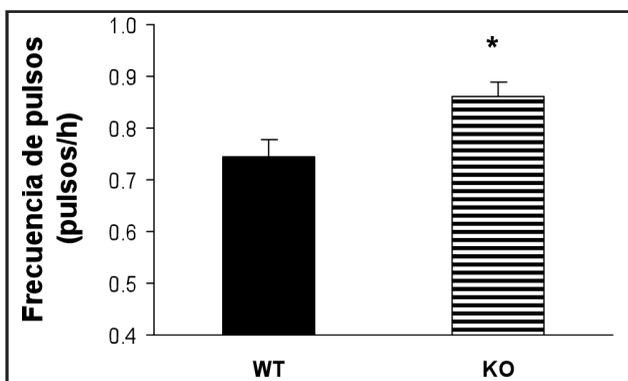
Dadas las diferencias encontradas en el contenido de GnRH hipotalámico y de glutamato y GABA entre las hembras salvajes y las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$ , se estudió la secreción pulsátil de GnRH en explantos de hipotálamos conteniendo el área preóptica, el hipotálamo anterior y el hipotálamo medio basal incubados *in vitro*, tomado muestras cada 8.5 minutos durante 6 horas. La frecuencia de pulsos de GnRH observada en los hipotálamos de los animales salvajes fue similar a la descrita en la literatura<sup>42</sup>. En los hipotálamos de hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  la frecuencia de los pulsos de GnRH resultó significativamente aumentada con respecto a las controles salvajes (Figura 6).

Otros parámetros evaluados como la amplitud y la duración de los pulsos, el intervalo inter-pulso promedio y la masa promedio de secreción del pulso no mostraron diferencias entre las hembras de ambos genotipos (no se muestra). Por lo tanto, a pesar de contar con un contenido hipotalámico menor de GnRH, la pulsatilidad de las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  resultó aumentada, es más, este menor contenido de GnRH podría estar reflejando un aumento en la liberación pulsátil.

Para estudiar la posible existencia de una diferente distribución de los intervalos inter-pulso como fuera propuesto por Heger y col.<sup>42</sup>, los intervalos fueron agrupados en dos categorías: aquellos con una duración menor o igual a 10 minutos y aquellos con una duración mayor a 10 minutos. El análisis de los datos mostró que mientras que en las hembras salvajes el mayor número de pulsos ocurren a intervalos largos (>10 min: 76%), en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  el número de pulsos a intervalos cortos no difiere del número de pulsos a intervalos largos (Figura 7), en concordancia con el aumento de frecuencia observado en estos animales (Análisis de la varianza de 2 factores, efectos principales: genotipo y duración del intervalo interpulso; interacción:  $p < 0,05$ ).

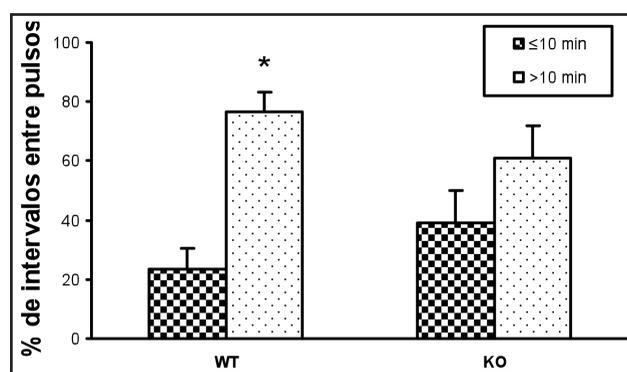
Este desajuste en la pulsatilidad de GnRH en la hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  plantea la existencia de un probable desequilibrio entre aferencias estimulatorias e inhibitorias que regulan la secreción de GnRH, de acuerdo con las alteraciones de los niveles de los neurotransmisores GABA y glutamato que describimos en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  adultas.

Resulta interesante destacar que Heger y col.<sup>42</sup> demostraron que la sobreexpresión de GAD-67 en neuronas GnRH, tratamiento que induce un aumento marcado del contenido de GABA en dichas neuronas, también produce un aumento de la pulsatilidad de GnRH en ratones hembras jóvenes, con alteraciones en los porcentajes de interpulsos largos y cortos, sin modificar la amplitud de los pulsos. Estos resultados junto con los nuestros indican que distintas disrupciones del sistema GABAérgico conducirían a alteraciones significativas en la pulsatilidad de GnRH. Los mismos autores sugieren que los mencionados efectos estarían mediados por los receptores GABAA<sup>41</sup>; es posible que en nuestro modelo, en ausencia de RGABAB funcionales, el efecto sobre la pulsatilidad haya sido también consecuencia de la estimulación de los receptores GABAA. Esto sugeriría que en el animal entero los RGABAB funcionarían como freno de la pulsatilidad, contribuyendo al control fino del sistema. No es sorprendente, además, que la ausencia de RGABAB funcionales afecta las neuronas GnRH, ya que se demostró la presencia de los RGABAB en muchas líneas celulares inmortalizadas de neuronas GnRH como GT-1, GT-7 y Gn-10<sup>35,73,74</sup>, en neuronas GnRH embrionarias que expresan la proteína verde fluorescente<sup>75</sup>, así como también en neuronas hipotalámicas *in situ*<sup>34</sup>.



**Figura 6.** Frecuencia de pulsatilidad de GnRH secretado a partir de explantos de hipotálamos de hembras adultas de ambos genotipos.

\*: significativamente diferente de hembras salvajes.



**Figura 7.** Porcentaje de intervalos interpulso de la secreción de GnRH a partir de explantos de hipotálamos de hembras adultas de ambos genotipos.

\*: interpulsos largos significativamente diferentes de interpulsos cortos en hembras salvajes (WT). En hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  (KO) no se observan diferencias.

*Evaluación de la eclosión puberal, ciclicidad y capacidad reproductiva en ratones hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  y salvajes*

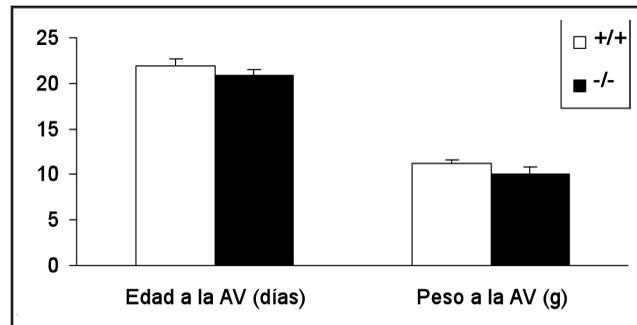
Finalmente, teniendo en cuenta las alteraciones encontradas en la secreción de gonadotropinas, los contenidos y la pulsatilidad de GnRH y los contenidos de los neurotransmisores GABA y glutamato, los siguientes estudios se enfocaron en puntos finales críticos para determinar la fisiología del eje como son la aparición de la pubertad, la determinación de la regularidad de los ciclos estrales y la capacidad reproductiva en las hembras de ambos genotipos.

Como mencionamos, el GABA también ejerce un papel crítico en el despertar puberal. Para establecer la participación de los RGABAB en este evento, determinamos en las hembras de ambos genotipos el día de apertura vaginal y los pesos corporales ese día, parámetros característicos de eclosión puberal. No se observaron diferencias significativas en la edad promedio de apertura vaginal entre hembras salvajes y hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$ . Así mismo, el peso corporal en el día de apertura vaginal fue similar entre las hembras salvajes y las  $GABA_{B1}^{-/-}$  (Figura 8)<sup>76</sup>.

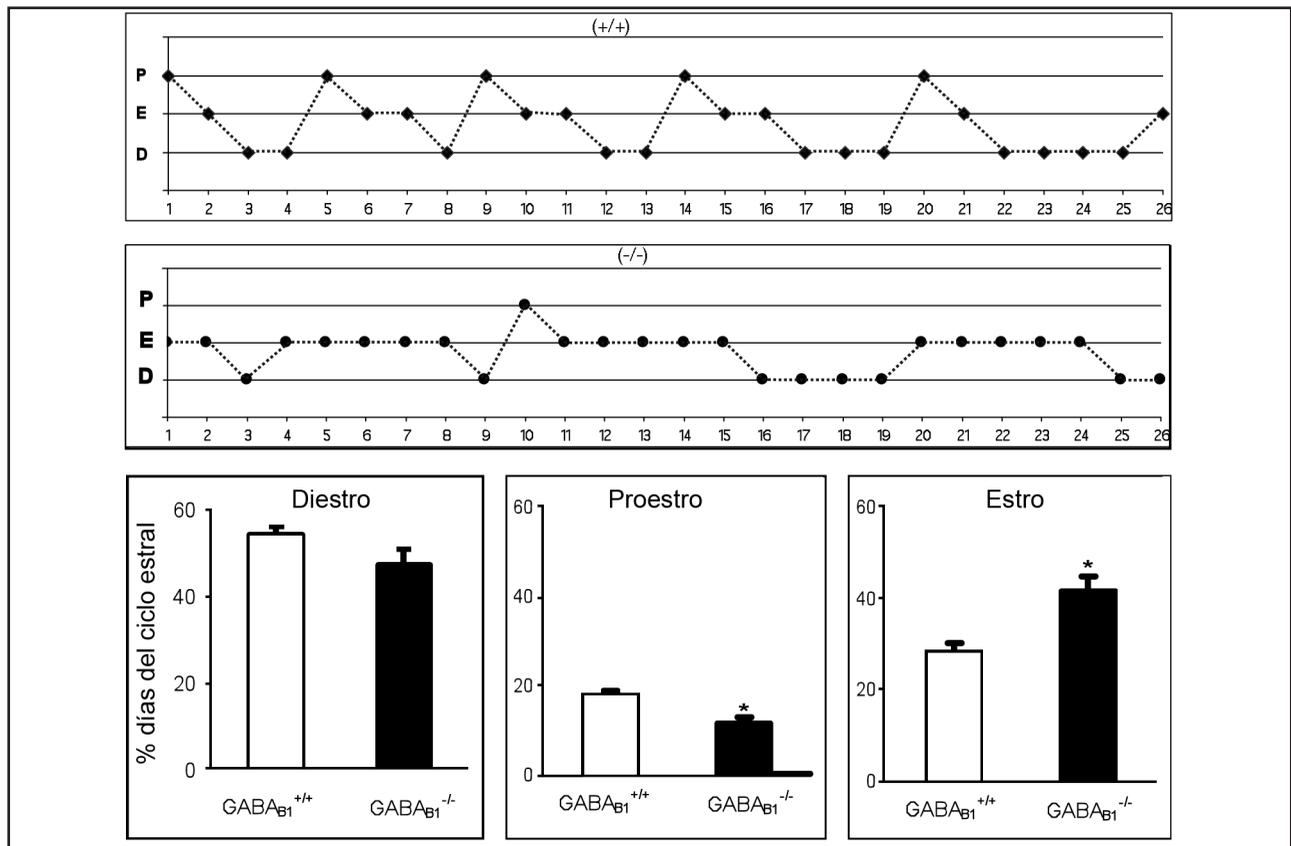
En un trabajo previo<sup>42</sup> se demostró que animales transgénicos en los que las neuronas GnRH sobre-expresaban GAD, y por ende presentaban altos niveles de

GABA, la pubertad no se vio afectada, similar a nuestros resultados con animales con falta de expresión de RGABAB funcionales.

Luego de establecer el estadio del ciclo estral por frotis vaginal en hembras adultas de ambos genotipos por 50 días, observamos que la ciclicidad resultó significativamente comprometida en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  (Figura 9). Estos animales mostraron largos períodos en estro ( $p < 0,001$ ), con disminución de la cantidad de proestros ( $p < 0,001$ ) en comparación con las hembras salvajes<sup>76</sup>. Estos resultados son muy similares a los demostrados



**Figura 8.** Parámetros de eclosión puberal en hembras de ambos genotipos. AV: apertura vaginal.



**Figura 9.** Perfiles representativos de la ciclicidad estral de hembras de ambos genotipos (panel superior). Porcentaje de días en cada fase del ciclo estral de hembras de ambos genotipos, \*: significativamente diferente de hembras salvajes (panel inferior).

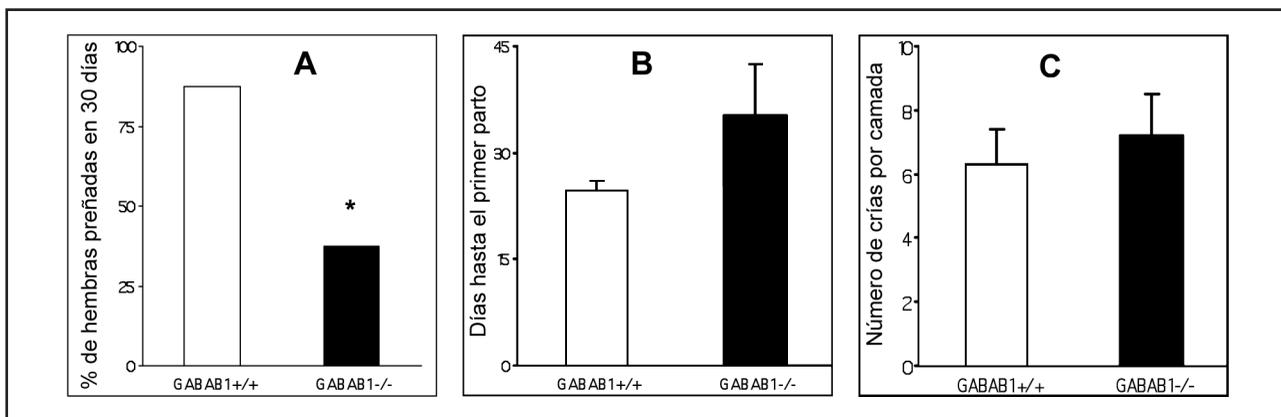
por Heger y col<sup>42</sup> en ratones que sobreexpresan GAD en neuronas GnRH, en los que también se observaban largos periodos en estro.

Al encontrar estas marcadas alteraciones en la ciclicidad, determinamos la función reproductiva en hembras de ambos genotipos. Demostramos que la función reproductiva de las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  está significativamente comprometida (Figura 10). El número de hembras preñadas en los primeros 30 días de exposición a un macho de fertilidad conocida fue menor en los animales  $GABA_{B1}^{-/-}$  (% de preñeces en los primeros 30 días: salvajes: 87,5%, n=8 vs.  $GABA_{B1}^{-/-}$ : 37,5%, n=8, prueba  $\chi^2$ : p<0,05). Observamos la presencia de un periodo de tiempo más prolongado entre la exposición de las hembras a los machos y el nacimiento de la primera camada de crías en los animales  $GABA_{B1}^{-/-}$ , aunque esta diferencia con respecto a los animales salvajes no alcanzó significatividad estadística (p<0,11). Así mismo, no observamos diferencias en el número de crías por camada entre los genotipos (prueba  $\chi^2$ , ns)<sup>76</sup>.

Aunque observamos diferencias en el índice de preñez entre los animales salvajes y  $GABA_{B1}^{-/-}$ , no nos era posible discriminar entre una posible falta de cópula por alteración de la conducta sexual, un incremento del tiempo necesario para alcanzar el proestro o una interrupción de la preñez en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$ . Respecto de las alteraciones del comportamiento no hay que olvidar que estos animales sufren de crisis epilépticas con cierta frecuencia e hiperlocomoción<sup>64</sup>, características que podrían estar comprometiendo su conducta reproductiva. Para intentar encontrar la causa del índice de preñez disminuido en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$ , sometimos a un nuevo grupo de hembras de ambos genotipos a la determinación diaria del estadio del ciclo estral, y en el día del proestro las colocamos en apareo con un macho de fertilidad conocida. Al día siguiente registramos la presencia

o ausencia del tapón vaginal, índice de cópula efectiva. No observamos diferencias entre los genotipos, ya que el 100% de las hembras colocadas en apareo en el día del proestro presentaron tapón vaginal cualquiera fuera su genotipo (Fig. 11A). Sin embargo, observamos una diferencia significativa al evaluar cuántas de estas hembras desarrollaban una preñez exitosa. Mientras que 6 de 8 hembras salvajes gestaron y parieron crías satisfactoriamente, solamente 1 de 7 hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  lo hicieron (prueba  $\chi^2$ : p<0,03) (Figura 11B).

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que, si bien los parámetros de eclosión puberal no mostraron claras diferencias entre los genotipos, la ciclicidad estral y la función reproductiva está significativamente alterada en las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$ . Se observaron periodos más largos en estro y más cortos en proestro en comparación con las controles salvajes; el número de hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  preñadas fue significativamente menor que el correspondiente número de hembras salvajes cuando éstas fueron expuestas a machos de fertilidad conocida por un período de tiempo determinado; por otro lado, mostramos que las hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  tenían un comportamiento de apareo normal cuando se encontraron en proestro. Sin embargo, se evidenciaron dificultades en la ovulación, fertilización y/o desarrollo de la preñez, ya que sólo 1 de 7 hembras  $GABA_{B1}^{-/-}$  que presentaron tapón vaginal desarrollaron una preñez exitosa. En la literatura se encuentran algunos trabajos que proponen la participación de los RGABAB en estos procesos, ya que estos receptores están presentes en: ovario<sup>77,78</sup>, placenta de rata<sup>62</sup>, oviducto y en miometrio<sup>79-83</sup>. Estos últimos trabajos sugieren que los RGABAB participarían en la modulación de contractilidad en oviducto y miometrio, estando involucrados, en consecuencia, en el tránsito del óvulo fecundado hacia el sitio de anidación.



**Figura 10.** Parámetros de la función reproductiva de hembras de ambos genotipos: porcentaje de hembras preñadas luego de 30 días de exposición al macho.(A), cantidad de días transcurridos desde la exposición al macho hasta el primer parto (B) y número de crías por camada (C). \*: Significativamente diferente de hembras salvajes.

## Conclusiones finales

En este trabajo demostramos la activa participación del GABA y sus RGABAB en el eje reproductivo, y en sus diferentes pero interrelacionados niveles: sistema nervioso central, hipofisario y gonadal. Estos resultados evidencian que la ausencia de RGABAB funcionales compromete significativamente la reproducción en ratones.

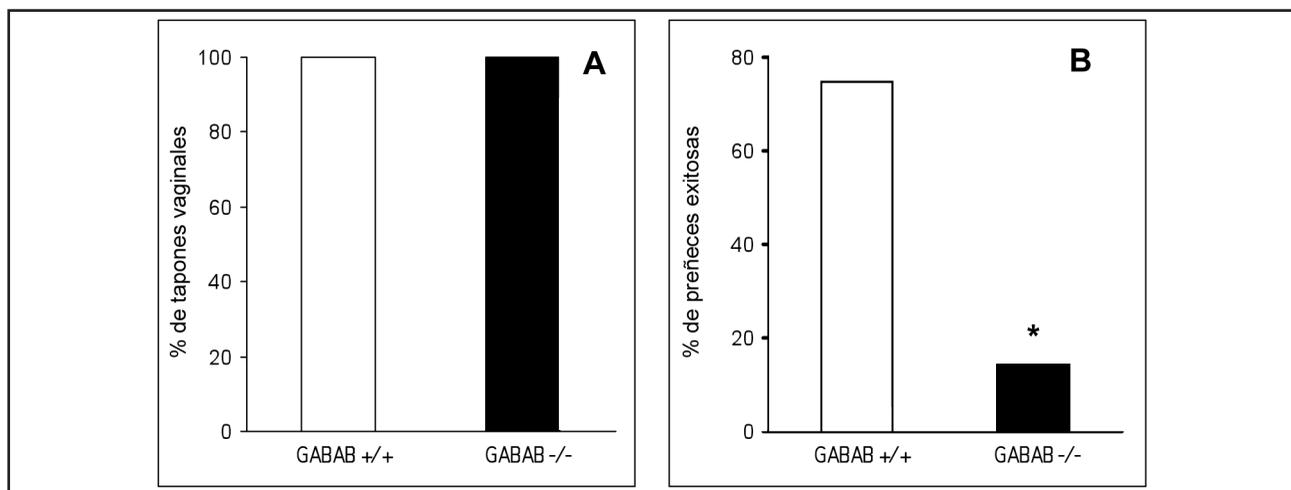
El presente estudio podría ayudar a esclarecer desórdenes endocrinos y reproductivos que pueden aparecer en patologías en las que los RGABAB podrían estar involucrados, como son la epilepsia, la espasticidad, la ansiedad, las alteraciones del sueño, la depresión y la adicción. En el caso particular de la epilepsia, se ha estudiado la posible relación de la presencia de polimorfismos de la subunidad GABAB1 del receptor con el desarrollo de epilepsia en humanos<sup>84</sup> y se demostró que determinados polimorfismos confieren una alta susceptibilidad a desarrollar epilepsia del lóbulo temporal<sup>85</sup>. También se demostró en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal una expresión alterada del ARN mensajero del RGABAB<sup>86,87</sup>. Recordemos que nuestro modelo experimental presenta también ataques espontáneos de epilepsia<sup>64</sup>. Por otro lado, las mujeres con epilepsia presentan un inusual aumento en la frecuencia de desórdenes menstruales, baja tasa de ovulación, altos índices de infertilidad<sup>88</sup>, así como también amenorrea y menopausia prematura<sup>89</sup>. Todos estos ejemplos demuestran la relevancia de nuestros resultados en el esclarecimiento de las causas y mecanismos de los desórdenes endocrinos y reproductivos que involucren alteraciones en los RGABAB.

Además, dado el creciente uso de agonistas y antagonistas del RGABAB en la clínica<sup>90</sup>, es importante esclarecer la participación de los mismos en la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal debido al

impacto que el uso prolongado de estas drogas pudiera tener sobre la reproducción.

## Referencias

1. Bowery NG, Smart TG. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S109-S119
2. Krnjevic K. How does a little acronym become a big transmitter? *Biochem Pharmacol* 2004;68:1549-55
3. Fonnum F. Biochemistry, anatomy, and pharmacology of GABA neurons. In: *Psychopharmacology: the third generation of progress*. New York, Raven Press, 1987; pp173-82
4. Beleboni R, Carolino R, Pizzo A, Castellan-Baldan L, Coutinho-Netto J, dos Santos W, Coimbra N. Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. *Cell Mol Neurobiol* 2004;24:707-28
5. Lujan R, Shigemoto R, Lopez-Bendito G. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 2005;130:567-80
6. Ondo JG. Gamma-aminobutyric acid effects on pituitary gonadotropin secretion. *Science* 1974;186:738-9
7. Libertun C, McCann SM. The effect of aminoxyacetic acid and other amino acids on plasma prolactin in the rat. *I R C S Med Sci* 1976;4:374
8. Mioduszewsky R, Grandison L, Meites J. Stimulation of prolactin release in rats by GABA. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976;151:44-6
9. Libertun C, Arakelian MC, Larrea GA, Foglia VC. Inhibition of prolactin secretion by GABA in female and male rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979;161:28-31
10. Arakelian MC, Foglia VG, Libertun C. Prolactin and



**Figura 11.** Porcentajes de tapón vaginal (A) y preñeces exitosas (B) de hembras de ambos genotipos colocadas en apareo en proestro. \*: Diferente de hembras salvajes.

milk ejection during the first 20 minutes of suckling in the rat: blockade by Nembutal and by amino oxyacetic acid. *Horm Metab Res* 1984;16:154

11. Fiszer de Plazas S, Becu D, Mitridate de Novara A, Libertun C. GABA receptors in anterior pituitary and brain areas after median eminence lesions. *Endocrinology* 1982;111:1974-8

12. Olsen RW, Tobin AJ. Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB J* 1990;4:1469-80

13. Haefely W, Kulcsár A, Möhler H, Pieri L, Polc P, Schaffner R. Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1975;(14):131-51

14. Chebib M, Johnston GA. The "ABC" of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:937-40

15. Bowery NG, Hill DR, Hudson A, Doble AL, Middlemiss DN, Shaw D, Turnbull M. (-) Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by action at a novel GABA receptor. *Nature* 1980;283:92-4

16. Bowery NG. GABA<sub>B</sub> receptor pharmacology. *Annual Review Pharmacology and Toxicology* 1993;33:109-47

17. Enna SJ, Bowery NG. GABA(B) receptor alterations as indicators of physiological and pharmacological function. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1541-8

18. Bowery NG. GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:37-43

19. Ulrich D, Bettler B. GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr Opin Neurobiol* 2007;17:298-303

20. Cho BN, Kim K. Differential effect of baclofen on hypothalamic GnRH and pituitary LH beta gene expression in steroid-treated rats. *Mol Cells* 1997;7:605-9

21. Nikolarakis KE, Loeffler JP, Almeida OF, Herz A. Pre- and postsynaptic actions of GABA on the release of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Brain Res Bull* 1988;21:677-83

22. Adler BA, Crowley WR. Evidence for Aminobutyric acid modulation of ovarian hormonal effects on luteinizing hormone secretion and hypothalamic catecholamine activity in female rats. *Endocrinology* 1986;118:91-7

23. Masotto C, Negro-Vilar A. Activation of t-aminobutyric acid B-receptors abolishes naloxone-stimulated luteinizing hormone release. *Endocrinology* 1987;121:2251-5

24. Hartman RD, He JR, Barraclough CA. Gamma-aminobutyric acid A and B receptor antagonist increase luteinizing hormone-releasing hormone neuronal responsiveness to intracerebroventricular norepinephrine in ovariectomized estrogen-treated rats. *Endocrinology* 1990;127:1336-45

25. Akema T, Kimura F. 2-Hydroxysaclofen, a potent GABA B receptor antagonist, stimulates luteinizing hormone secretion in female rats. *Brain Res* 1991;546:143-5

26. Donoso AO, Lopez FJ, Negro-Vilar A. Cross-talk between excitatory and inhibitory amino acids in the regulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 1992;131:1559-61

27. Kang SH, Seong JY, Cho S, Cho H, Kim K. Acute increase of GABAergic neurotransmission exerts a stimulatory effect on GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized, estrogen- and progesterone-treated adult female rats. *Neuroendocrinology* 1995;61:486-92

28. Wagner EJ, Ronnekleiv OK, Bosch MA, Kelly MJ. Estrogen biphasically modifies hypothalamic GABAergic function concomitantly with negative and positive control of luteinizing hormone release. *J Neurosci* 2001;21:2085-93

29. Lamberts R, Vijayan E, Graf M, Mansky T, Wuttke W. Involvement of preoptic-anterior hypothalamic GABA neurons in the regulation of pituitary LH and prolactin release. *Exp Brain Res* 1983;52:356-62

30. Fuchs E, Mansky T, Stock KW, Vijayan E, Wuttke W. Involvement of catecholamines and glutamate in GABAergic mechanism regulatory to luteinizing hormone and prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 1984;38:484-9

31. Donoso AO, Seltzer AM, Navarro CE, Cabrera RJ, Lopez FJ, Negro-Vilar A. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone secretion by hypothalamic amino acids. *Braz J Med Biol Res* 1994;27:921-32

32. Leranthe C, Maclusky NJ, Sakamoto H, Shanabrough M, Naftolin F. Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 1985;40:536-9

33. Lagrange AH, Wagner EJ, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. Estrogen rapidly attenuates a GABAB response in hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 1996;64:114-23

34. Sliwowska JH, Billings HJ, Goodman RL, Lehman MN. Immunocytochemical colocalization of GABA-B receptor subunits in gonadotropin-releasing hormone neurons of the sheep. *Neuroscience* 2006;141:311-9

35. Garyfallou VT, Lemos D, Urbanski HF. Expression profiling of genes encoding glutamate and GABA receptor subunits in three immortalized GnRH cell lines. *Brain Res* 2006;1086:50-4

36. Masotto C, Wisniewski G, Negro-Vilar A. Different gamma-aminobutyric acid receptor subtypes are involved in the regulation of opiate-dependent and independent luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 1989;125:548-53

37. Carbone S, Ponzo O, Szwarcfarb B, Rondina D, Reynoso R, Scacchi P, Alberto MJ. Ontogenic modifications in the effect of the GABAergic system on the hypothalamic excitatory amino acids: its relationship with GABAergic control of gonadotrophin secretion during sexual maturation in female rats. *Brain Res Dev Brain Res* 2002;133:13-8
38. Vijayan E, McCann SM. The effect of intraventricular injection of gamma-aminobutyric acid (GABA) on prolactin and gonadotropin release in conscious female rats. *Brain Res* 1978;155:35-43
39. Moguilevsky JA, Wuttke W. Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:188-95
40. Bilger M, Heger S, Brann DW, Paredes A, Ojeda SR. A conditional tetracycline-regulated increase in Gamma amino butyric acid production near luteinizing hormone-releasing hormone nerve terminals disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* 2001;142:2102-4
41. DeFazio RA, Heger S, Ojeda SR, Moenter SM. Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol* 2002;16:2872-91
42. Heger S, Seney M, Bless E, Schwarting GA, Bilger M, Mungenast A, Ojeda SR, Tobet SA. Overexpression of glutamic acid decarboxylase-67 (GAD-67) in gonadotropin-releasing hormone neurons disrupts migratory fate and female reproductive function in mice. *Endocrinology* 2003;144:2566-79
43. Gay VL, Midgley AR Jr. Response of the adult rat to orchidectomy and ovariectomy as determined by LH radioimmunoassay. *Endocrinology* 1969;84:1359-64
44. Luderer U, Schwartz NB. Acute changes in pulsatile LH and FSH secretion after ovariectomy in rats: treatment with oestradiol for 24 h suppresses LH, but not FSH, for at least 48 h. *J Reprod Fertil* 1994;100:613-21
45. Terasawa E, Luchansky LL, Kasuya E, Nyberg CL. 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* 1999;11:275-82
46. Mitsushima D, Marzban F, Luchansky LL, Burich AJ, Keen KL, Durning M, Golos TG, Terasawa E. Role of glutamic acid decarboxylase in the prepubertal inhibition of the luteinizing hormone releasing hormone release in female rhesus monkeys. *J Neurosci* 1996;16:2563-73
47. Clarkson J, Herbison AE. Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neuron in relation to puberty. *Mol Cell Endocrinol* 2006;254-255:32-8
48. Anderson R, Mitchell R. Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonist on the secretion of growth hormone, luteinizing hormone, adrenocorticotrophic hormone and thyroid-stimulating hormone from the rat pituitary gland in vitro. *J Endocrinol* 1986;108:1-8
49. Virmani MA, Stojilkovic SS, Catt KJ. Stimulation of luteinizing hormone release by g-aminobutyric acid (GABA) agonists: mediation by GABA A-type receptors and activation of chloride and voltage-sensitive calcium channels. *Endocrinology* 1990;126:2499-505
50. Brann DW, Zamorano PL, Putnam-Roberts CD, Mahesh VB. GABA-opioid interactions in the regulation of gonadotropin secretion in the immature female rat. *Neuroendocrinology* 1992;56:445-52
51. Lux-Lantos VAR, Rey EB, Libertun C. Activation of GABA B receptors in the anterior pituitary inhibits prolactin and luteinizing hormone secretion. *Neuroendocrinology* 1992;56:687-93
52. Rey-Roldán EB, Lux-Lantos VAR, Gonzalez Iglesias A, Becu-Villalobos D, Libertun C. Baclofen, a Gamma-aminobutyric acid B agonist, modifies hormonal secretion in pituitary cells from infantile female rats. *Life Sci* 1996;58:1059-65
53. Lux-Lantos V, Becu-Villalobos D, Bianchi M, Rey-Roldán EB, Chamson-Reig A, Pignataro O, Libertun C. GABAB receptors in anterior pituitary cells. Mechanism of action coupled to endocrine effects. *Neuroendocrinology* 2001;73:334-43
54. Tillakaratne NJ, Erlander MG, Collard MW, Greif KF, Tobin AJ. Glutamate decarboxylases in nonneural cells of rat testis and oviduct: differential expression of GAD65 and GAD67. *J Neurochem* 1992;58:618-27
55. Geigerseder C, Doepner R, Thalhammer A, Frungieri MB, Gamel-Didelon K, Calandra RS, Kohn FM, Mayerhofer A. Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis: local GABA production and GABA receptors. *Neuroendocrinology* 2003;77:314-23
56. Ritta MN, Campos MB, Calandra RS. Coexistence of gamma-aminobutyric acid type A and type B receptors in testicular interstitial cells. *J Neurochem* 1991;56:1236-40
57. He X, Zhang Y, Yan Y, Li Y, Koide SS. Identification of GABABR2 in rat testis and sperm. *J Reprod Dev* 2003;49:397-402
58. Hu JH, Zhang JF, Ma YH, Jiang J, Yang N, Li XB, Yu Chi ZG, Fei J, Guo LH. Impaired reproduction in transgenic mice overexpressing Gamma-aminobutyric acid transporter I (GAT1). *Cell Res* 2004;14:54-9
59. Ritta MN, Campos MB, Calandra RS. Effect of GABA and benzodiazepines on testicular androgen production. *Life Sci* 1987;40:791-8
60. Schaeffer JM, Hsueh AJ. Identification of gamma-aminobutyric acid and its binding sites in the rat ovary. *Life Sci* 1982;30:1599-604

61. Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor P, Bischoff S, Mickel S, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B. Expression cloning of GABA B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 1997;386:239-46
62. Kaupmann K, Malitschek B, Schuler B, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. GABA B receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 1998;396:683-7
63. Zhang H, Ni J, Zhang W, Tian SJ. [GABA inhibits progesterone production of luteal cells of rat ovary]. *Sheng Li Xue Bao* 2000;52:185-7
64. Schuler V, Luscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Heid J, Gentry C, Urban L, Fox A, Spooren W, Jatton AL, Vigouret J, Pozza M, Kelly PH, Mosbacher J, Froestl W, Kaslin E, Korn R, Bischoff S, Kaupmann K, van der Putten H, Bettler B. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron* 2001;31:47-58
65. Culler MD, Negro-Vilar A. Passive immunoneutralization of endogenous inhibin: sex-related differences in the role of inhibin during development. *Mol Cell Endocrinol* 1988;58:263-73
66. Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Libertun C. Ontogenic studies of the neural control of the adeno-hypophyseal hormones in the rat: Gonadotropins. *Cell Mol Neurobiol* 1990;10:473-84
67. Mayerhofer A, Höne-Zell B, Gamel-Didelon K, Jung H, Redecker P, Grube D, Urbanski HF, Gasnier B, Fritschy JM, Gratzl M. Gamma-aminobutyric acid (GABA): a para- and/or autocrine hormone in the pituitary. *FASEB J* 2001;15:1089-91
68. Gonzalez IA, Diaz-Torga G, Piroli G, Achaval-Zaia R, De Nicola AF, Libertun C, Becu-Villalobos D. Bromocriptine restores angiotensin II response in pituitary hyperplasia. *Mol Cell Endocrinol* 2000;165:67-74
69. Rey-Roldan EB, Bianchi MS, Bettler B, Becu-Villalobos D, Lux-Lantos VA, Libertun C. Adenohypophyseal and hypothalamic GABA B receptor subunits are downregulated by estradiol in adult female rats. *Life Sci* 2006;79:342-50
70. Hood S, Schwartz NB. Sex difference in serum luteinizing hormone postgonadectomy in the rat. *Endocrine* 2000;12:35-40
71. Seltzer AM, Donoso AO. Restraining action of GABA on estradiol-induced LH surge in the rat: GABA A activity in brain nuclei and effects of GABA mimetics in the medial preoptic nucleus. *Neuroendocrinology* 1992;55:28-34
72. Akema T, Kimura F. Modulation of pulsatile LH secretion by baclofen, a selective GABA B receptor agonist, in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 1992;56:141-7
73. Martinez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI. Biphasic gabaergic regulation of GnRH secretion in GT1 cell lines. *Neuroendocrinology* 1994;59:420-5
74. Tobet SA, Bless EP, Schwarting GA. Developmental aspect of the gonadotropin-releasing hormone system. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185:173-84
75. Fujioka H, Yamanouchi K, Akema T, Nishihara M. The Effects of GABA on embryonic gonadotropin-releasing hormone neurons in rat hypothalamic primary culture. *J Reprod Dev* 2007;53:323-31
76. Catalano PN, Bonaventura MM, Silveyra P, Bettler B, Libertun C, Lux-Lantos VA. GABA(B1) Knockout Mice Reveal Alterations in Prolactin Levels, Gonadotropic Axis, and Reproductive Function. *Neuroendocrinology* 2005;82:294-305
77. Kannisto P, Owman C, Schmidt G, Walles B. Evidence for prejunctional GABAB receptors mediating inhibition of ovarian follicle contraction induced by nerve stimulation. *Eur J Pharmacol* 1986;122:123-9
78. Castelli MP, Ingianni A, Stefanini E, Gessa GL. Distribution of GABAB receptor mRNAs in the rat brain and peripheral organs. *Life Sci* 1999;64:1321-8
79. Erdo SL, Riesz M, Karpati E, Szporny L. GABAB receptor-mediated stimulation of the contractility of isolated rabbit oviduct. *Eur J Pharmacol* 1984;99:333-6
80. Riesz M, Erdo SL. GABAB receptors in the rabbit uterus may mediate contractile responses. *Eur J Pharmacol* 1985;119:199-204
81. Laszlo A, Nadasy GL, Erdo SL, Monos E, Siklosi G, Zsolnai B. Effects of GABA on the spontaneous muscular activity of the human fallopian tube ampullar segments in vitro. *Acta Physiol Hung* 1990;76:123-30
82. Majewska MD, Vaupel DB. Steroid control of uterine motility via gamma-aminobutyric acidA receptors in the rabbit: a novel mechanism? *J Endocrinol* 1991;131:427-34
83. Sergeev PV, Sizov PI, Dukhanin AS. [The GABAergic system of the myometrium: a basis for the clinical study of GABA-positive substances as pregnancy protectors]. *Biull Eksp Biol Med* 1993;116:601-3
84. Peters HC, Kammer G, Volz A, Kaupmann K, Ziegler A, Bettler B, Epplen JT, Sander T, Riess O. Mapping, genomic structure, and polymorphisms of the human GABABR1 receptor gene: evaluation of its involvement in idiopathic generalized epilepsy. *Neurogenetics* 1998;2:47-54

85. Gambardella A, Manna I, Labate A, Chifari R, La Russa A, Serra P, Cittadella R, Bonavita S, Andreoli V, LePiane E, Sasanelli F, Di Costanzo A, Zappia M, Tedeschi G, Aguglia U, Quattrone A. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003;60:560-3
86. Billinton A, Baird VH, Thom M, Duncan JS, Upton N, Bowery NG. GABA(B(1)) mRNA expression in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;86:84-9
87. Princivalle AP, Duncan JS, Thom M, Bowery NG. GABA(B1a), GABA(B1b) AND GABA(B2) mRNA variants expression in hippocampus resected from patients with temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2003;122:975-84
88. Herzog AG, Fowler KM. Sexual hormones and epilepsy: threat and opportunities. *Curr Opin Neurol* 2005;18:167-72
89. Hamed SA. Neuroendocrine hormonal conditions in epilepsy: relationship to reproductive and sexual functions. *Neurologist* 2008;14:157-69
90. Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian g-Aminobutyric acid<sub>B</sub> receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 2002;54:247-64