

Tesis Doctoral

Receptores GABAB en el eje hipotálamo-hipofisario: ontogenia, regulación de su expresión y mecanismo de acción

Bianchi, María Silvia

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en Ciencias Biológicas de la
Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bianchi, María Silvia. (2004). Receptores GABAB en el eje hipotálamo-hipofisario: ontogenia, regulación de su expresión y mecanismo de acción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3760_Bianchi

Cita tipo Chicago:

Bianchi, María Silvia. "Receptores GABAB en el eje hipotálamo-hipofisario: ontogenia, regulación de su expresión y mecanismo de acción". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3760_Bianchi

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Receptores GABA_B en el eje
hipotálamo-hipofisario:
ontogenia, regulación de su expresión y
mecanismo de acción**

Autor: Lic. María Silvia Bianchi
Director: Dra. Victoria Lux de Lantos

**Tesis presentada para optar por el título
de Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

37 2004

**Laboratorio de Neuroendocrinología
Instituto de Biología y Medicina Experimental
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Vuelta de Obligado 2490 – Buenos Aires**

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**GABA_B Receptors in the
hypothalamic-hypophyseal unit:
ontogeny, regulation of their expression and
mechanism of action**

**Author: Lic. María Silvia Bianchi
Director: Dra. Victoria Lux de Lantos**

Doctoral Thesis

2004

**Laboratorio de Neuroendocrinología
Instituto de Biología y Medicina Experimental
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Vuelta de Obligado 2490 – Buenos Aires**

A Sebastián, María Agustina y Juan Cruz

Agradecimientos

A la Dra. Lux-Lantos, Vicky, por haberse embarcado conmigo en este proyecto, como directora. Por su gran capacidad de trabajo que se refleja en la pelea de todos los días para alcanzar nuestras metas, por su total disposición a discutir unos resultados o planificar nuevos experimentos. Por poder contar siempre con ella, no sólo en lo laboral sino también en lo personal. Por acompañarme y muchas veces empujarme, a lo largo de este camino que se concreta con esta tesis. Porque sin ella, ésta no sería la misma.

Al Dr. Carlos Libertun, por la confianza depositada en mí al permitirme ingresar a su grupo de trabajo. Por darme la posibilidad de dedicarme a la investigación cuando creía que no era factible para mí. Por su apoyo y entusiasmo constante. Por ser un gran investigador y una gran persona.

A los libertunes: Lucas, María, Marina, Paolo, Pato y nuevamente Vicky (por orden alfabético así nadie se ofende), por crear entre todos un ambiente donde prevalece el compañerismo y es muy agradable trabajar. Por los consuelos cuando los Westerns o las PCRs no daban, por siempre haber alguien dispuesto a brindar una mano o a discutir una técnica, por los nervios y congresos compartidos, por los momentos gratos y no tan gratos vividos, por el mate a cualquier hora (obviamente siempre con agua estéril), por las fiestas de fin de año y por muchas, muchas, muchas cosas más. Y a todos los que una forma u otra pasaron por el lab y ya no están en él

A los becucuevinos: Damasia, Graciela, Ceci, Isabel, Carolina, Jorge y Ana María, (en orden de ingreso al laborototio que obviamente nada tiene que ver con la edad), por los café de la mañana y todos los momentos compartidos, por los consejos experimentales, westernianos y computacionales. Por poder contar con ustedes, por ser en la práctica parte de nuestro laboratorio.

Al resto del personal del IBYME, por su buena disposición tanto a responder consultas como a ayudar en lo material.

Al IBYME y al CONICET, por brindarme la infraestructura y el equipamiento necesario para poder realizar mi tesis doctoral

Al CONICET, por haberme otorgado la beca de formación de postgrado que posibilitó la realización de esta tesis.

A mi gran familia, mis hermanos: Gabriela, Cecilia, Pablo, Gustavo y Marcela, mi mamá Coty y mi tía Nidel, por todo el cariño, aliento y apoyo que siempre me brindaron. Especialmente a mi mamá quien con gran esfuerzo y sacrificio me permitió acceder a una formación universitaria y que con su ejemplo me enseñó a no rendirme frente a las situaciones adversas.

A mis abuelos Víctor y Maruca, por todo el afecto y la contención que me brindaron. Siempre van a estar en mi corazón junto a papá.

A Lucy y Paula, por su aliento y ayuda incondicional aún a la distancia.

A mis grandes amores: Sebastián, María Agustina y Juan Cruz por todas las horas robadas, por el apoyo, la comprensión y la paciencia que me tuvieron y me tienen, a ellos les dedico de corazón esta tesis.

Los resultados presentados en esta Tesis de Doctorado dieron origen a tres trabajos publicados en revistas internacionales con arbitraje y a un cuarto trabajo que ha sido enviado para ser evaluado para su publicación.

"Ontogenic expression of anterior pituitary GABA_B receptor subunits" M. Bianchi, E. Rey-Roldán, B. Bettler, D. Ristig, B. Malitschek, C. Libertun and V. Lux-Lantos. *Neuropharmacology*, 2001;40: 185-192.

"GABA_B Receptors in Anterior Pituitary Cells. Mechanism of Action Coupled to Endocrine Effects". V. Lux-Lantos, D. Becú-Villalobos, M. Bianchi, E. Rey-Roldán, A. Chamson-Reig, O. Pigntaro and C. Libertun. *Neuroendocrinology*, 2001; 73: 334-343.

"Effect of androgens on sexual differentiation on pituitary GABAB receptor subunits expression". María S. Bianchi, Paolo N. Catalano, María M. Bonaventura, Patricia Silveyra, Bernhard Bettler, Carlos Libertun and Victoria A.R. Lux-Lantos. *Neuroendocrinology*, *en prensa*.

"Regulation of GABA_B receptor subunits expression by GABA and sex steroids in male and female anterior pituitary cells". María S. Bianchi, María M. Bonaventura, Bernhard Bettler, Carlos Libertun and Victoria A.R. Lux-Lantos. *Trabajo enviado*.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue el estudio de los receptores GABA_B en la pituitaria anterior y el hipotálamo de ratas hembras y machos durante el desarrollo y en la adultez. Observamos un patrón de expresión ontogénico, con una disminución de la expresión de ambas subunidades del receptor GABA_B (RGABA_B) a lo largo del desarrollo, encontrándose sus niveles más bajos en la adultez. En la hipófisis anterior determinamos, además, una clara expresión sexualmente dimórfica, siendo los niveles del receptor significativamente más abundantes en ratas hembras que en machos en edades tempranas de desarrollo. Esta diferencia sexual depende del nivel de andrógenos presente durante etapas críticas de diferenciación sexual, ya que la supresión de los dos picos androgénicos en el macho lleva a una expresión alta, tipo hembra, mientras que la administración neonatal de testosterona a las hembras disminuye la expresión del RGABA_{B1} a niveles de macho.

Los niveles hipotalámicos de GABA siguen el mismo patrón que la expresión de los RGABA_{B1} hipofisarios y este neurotransmisor es capaz de inducir la expresión de RGABA_{B1} exclusivamente en células adenohipofisarias de hembras. Los andrógenos, por su parte, inducen la expresión de la subunidad RGABA_{B2} en ambos sexos, marcando así una regulación diferencial para cada subunidad del RGABA_B.

Los RGABA_B hipofisarios están acoplados a proteínas G i/o, y su activación disminuye los niveles de AMPc y lleva al cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje, modulando así la secreción hormonal.

Los RGABA_B en el hipotálamo muestran patrones ontogénicos similares a los hipofisarios, sin evidenciarse diferencias sexuales en su expresión en edades tempranas de desarrollo.

Palabras claves

Receptor GABA_B

Hipófisis

Hipotálamo

Diferenciación sexual

Expresión génica

Mecanismo de acción

ABSTRACT

The aim of the present thesis was the study of GABA_B receptors (RGABA_B) in the anterior pituitary and the hypothalamus in adult and developing male and female rats.

We observed an ontogenic expression pattern for this receptor, showing a decrease in both subunits along development, with the lowest levels being detected at adulthood. Furthermore, in the anterior pituitary, we described a clear sexually dimorphic expression of RGABA_B. These receptors are significantly more abundant in females than in males early in development. This sex difference depends on androgen levels present in the male in critical stages of differentiation, as suppression of both androgenizing peaks in males leads to high, female-like expression levels, while neonatal testosterone administration to females decreases pituitary RGABA_B expression to male titers.

Hypothalamic GABA titers follow the same pattern as pituitary RGABA_B expression levels and this neurotransmitter induces an increase in RGABA_{B1} expression exclusively in female anterior pituitary cells. Moreover, androgens induce RGABA_{B2} expression in pituitary cells of both sexes, demonstrating a differential regulation in the expression of each RGABA_B subunit.

Pituitary GABA_B receptors are coupled to Gi/o proteins and their activation lead to a decrease in cAMP levels and to the closure of voltage sensitive calcium channels, modulating, thus, hormonal secretion.

Hypothalamic RGABA_B follow ontogenic expression patterns similar to the hypophysis, without evidencing sex differences at early stages of development.

Keywords

GABA_B Receptor
Pituitary
Hypothalamus
Sexual differentiation
Gene expression
Mechanism of action

ABREVIATURAS

Ácido 3-aminopropil-fosfónico	3-APPA
Ácido 3-aminopropil-metil-fosfónico	3-APMPA
Ácido desoxiribonucleico copia	ADNc
Ácido desoxiribonucleico	ADN
Ácido ribonucleico mensajero	ARNm
Ácido ribonucleico	ARN
Ácido tetrahidropiridin metilfosfónico	TPMPA
Ácido γ aminobutírico	GABA
Ácido cis-aminocrotónico	CACA
Adenosina difosfato	ADP
Adenosina monofosfato cíclica	AMPc
ADN polimerasa de la bacteria termofílica <i>Thermus aquaticus</i>	Taq
Albúmina de suero bovino	BSA
Análisis de la varianza	ANOVA
Angiotensina II	AtII
Área Preóptica	APO
Baclofen	BACL
Bicuculina	BIC
Canales de calcio dependientes de voltaje	VSCC
Canales de potasio rectificadores entrantes regulados por proteína G	GIRK ó KIR3
Células transformadas de epitelio de riñón humano	HEK293
Cloruro de Bario	Ba ²⁺
Constante de disociación	Kd
Corticotrofina	ACTH
Densidad óptica	D.O.
Desoxinucleótidos trifosfatos	dNTPs
Dihidrotestosterona	DHT
Ditiotreitol	DTT
Dopamina	DA
Eminencia media	EM
Enzima ácido glutámico decarboxilasa	GAD
Enzima degradadora de ADN	DNAsa
Enzima degradadora de ARN	RNAsa
Enzima GABA amino transferasa	GABA-T
Enzima semialdehído succínico deshidrogenada	SSADH
Epinefrina	E
Estradiol	E ₂
Factor determinante de testículo	TDF
α -fetoproteína	AFP
Flutamida	Flut
Forskolina	F
Fosfolipasa A ₂	PLA ₂
Fosfolipasa C	PLC
2 hidroxisaclofen	2OH

Hipotálamo	HT
Hipotálamo anterior	HTA
Hipotálamo medio	HTM
Hipotálamo medio basal	HTMB
Hipotálamo medio dorsal	HTMD
Hipotálamo medio lateral	HTML
Hipotálamo posterior	HTP
Hormona de crecimiento	GH
Hormona estimuladora de melanocitos	MSH
Hormona foliculoestimulante	FSH
Hormona inhibitoria de la liberación de GH	SRIH o Somatostatina
Hormona liberadora de corticotrofina	CRH
Hormona liberadora de gonadotrofinas	GnRH
Hormona liberadora de hormona de crecimiento	GHRH
Hormona liberadora de tirotrófina	TRH
Hormona luteinizante	LH
Inhibidor de tripsina de <i>Lime bean</i>	LBI
Línea celular de médula ósea	CCL
Línea celular de ovario de ovario de Hamster	CHO
<i>Minimum Essential Media</i>	MEM
Neuropéptido Y	NPY
Nifedipina	NIFE
Norepinefrina	NE
Núcleo arcuato	NA
Núcleo dorsomedial	NDM
Núcleo paraventricular	NPV
Núcleo ventromedial	NVM
Péptido intestinal vasoactivo	VIP
Progesterona	P ₄
Prolactina	PRL
Pro-opiomelanocortina	POMC
Propionato de testosterona	TP
Proteína ligadora del elemento respondedor a AMPc	CREB
Proteína quinasa A	PKA
Proteína quinasa C	PKC
Proteína quinasa regulada por mitógenos	MAPK
Proteínas modificadoras de la actividad del receptor	RAMP
Radioinmunoensayo	RIA
Reacción n cadena de la polimerasa	PCR
Receptor de 7 dominios transmembrana	7 DTM
Receptor de GABA	RGABA
Receptores acoplados a proteína G	GPCR
Retículo endoplasmático	RE
Semialdehído succínico	SSA
Sistema dopaminérgico periventriculo-hipofisario	PHDA
Sistema dopaminérgico tuberohipofisario	THDA

Sistema dopaminérgico tuberoinfundibular	TIDA
Sistema gabaérgico tuberohipofisario	THGABA
Sistema gabaérgico tuberoinfundibular	TIGABA
Sistema nervioso central	SNC
Testosterona	T
Tetra acetato de etilenglicol bis(β -aminoetiléter)	EGTA
Tetra acetato del ácido etilendinitrilo	EDTA
Tetraetilamonio	TEA
Tirotrofina	TSH
Toxina de Pertussis	PTX
Transcripción reversa	RT
Transcriptasa reversa de virus Moloney de leucemia murina	MMLV
Verapamil	VERA

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
SISTEMA NEUROENDÓCRINO	2
Organización anátomo-funcional del hipotálamo	2
Organización anátomo-funcional de la hipófisis.....	7
Relación neurohemal entre el hipotálamo y la hipófisis.	10
REGULACIÓN DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISARIO	12
Regulación de la secreción de gonadotrofinas	14
<i>Retroalimentación negativa de gonadotrofinas en hembras</i>	<i>16</i>
<i>Retroalimentación positiva de gonadotrofinas en hembras</i>	<i>16</i>
<i>Regulación de la secreción de gonadotropinas en machos</i>	<i>17</i>
<i>Regulación de la secreción de gonadotrofinas por péptidos gonadales</i>	<i>17</i>
<i>Regulación intraglandular de la secreción de gonadotrofinas</i>	<i>18</i>
Regulación de la secreción de prolactina.....	18
<i>Regulación hipotalámica de la secreción de PRL.....</i>	<i>18</i>
<i>Regulación de la secreción de PRL por esteroides gonadales.....</i>	<i>20</i>
<i>Regulación intraglandular de la secreción de PRL.....</i>	<i>20</i>
DIFERENCIACIÓN SEXUAL Y ONTOGENIA	20
Determinación cromosómica del sexo	21
Diferencias sexuales en la fisiología reproductiva.....	22
Proceso de diferenciación sexual del SNC: marco temporal y factores intervinientes.....	23
<i>Alteraciones en el proceso de diferenciación sexual por tratamientos experimentales</i>	<i>25</i>
Hormonas sexuales y neurotransmisores	27
EL ÁCIDO γ-AMINOBUTÍRICO.....	28
Metabolismo del ácido γ amino butírico (GABA)	28
Receptores gabaérgicos.....	30
<i>Características de los Receptores GABA_A y GABA_C.....</i>	<i>30</i>
<i>Características de los Receptores GABA_B.....</i>	<i>32</i>
Regulación GABAérgica de la función hipofisaria.	39
GABA y secreción de las hormonas de la hipófisis anterior	41
<i>GABA y secreción de gonadotrofinas.....</i>	<i>41</i>
<i>GABA y secreción de Prolactina</i>	<i>43</i>
<i>GABA y secreción de otras hormonas hipofisarias</i>	<i>44</i>
OBJETIVOS GENERALES.....	45
 CAPÍTULO I: Expresión ontogénica de las subunidades del receptor GABA_B en la hipófisis anterior y el hipotálamo.....	 47
INTRODUCCIÓN	48
MATERIALES Y MÉTODOS	50
Animales	50

Obtención de membranas celulares.....	50
Análisis de Western blots.....	51
Ensayo de radiorreceptor	54
Análisis estadístico.....	55
RESULTADOS.....	56
Expresión de las subunidades del receptor GABA _B durante el desarrollo en glándulas adenohipofisarias de ratas hembra y macho	56
Ensayo de unión de radioligando al receptor GABA _B adenohipofisario en ratas hembras y machos en desarrollo	60
Expresión de las subunidades del receptor GABA _B durante el desarrollo en hipotálamos de ratas hembra y macho.	62
DISCUSIÓN	67

CAPÍTULO II: Efecto de la diferenciación sexual sobre la expresión de la subunidad RGABA_{B1} del receptor GABA_B....

INTRODUCCIÓN	74
MATERIALES Y MÉTODOS	76
Animales	76
<i>Primer diseño experimental</i>	76
<i>Segundo diseño experimental</i>	77
<i>Tercer diseño experimental</i>	78
Obtención de membranas.....	79
Análisis de <i>Western blot</i>	79
Determinación de neurotransmisores aminoacídicos por HPLC	79
Dosificación Hormonal.....	80
Radioinmunoanálisis (RIA) para hormonas proteicas	80
<i>Hormona Luteinizante (LH)</i>	81
<i>Hormona Folículo Estimulante (FSH):</i>	83
Radioinmunoanálisis para Hormonas Esteroideas	83
<i>Testosterona</i>	83
Preparación del ARN total y análisis de RT-PCR	85
<i>Obtención del ARN</i>	85
<i>Retrotranscripción de los ARNs</i>	85
<i>Amplificación de los ADNc por reacción en cadena de la polimerasa para RGABA_{B1} y β actina</i>	86
Drogas	89
Análisis estadísticos	89
RESULTADOS.....	90
Efectos de la androgenización neonatal de las hembras y de la castración en machos sobre la expresión de RGABA _{B1} y los niveles hormonales.	90
Efectos del tratamiento <i>in utero</i> con Flutamida en los machos y de la administración de bajas dosis de testosterona en las hembras sobre la diferenciación sexual de la expresión de la subunidad del receptor GABA _{B1} y sobre los niveles hormonales	94

Efectos de la manipulación perinatal de las hormonas sexuales sobre los niveles de neurotransmisores aminoacídicos: correlación con la expresión adenohipofisaria de los RGABA _B	100
Efectos de los protocolos de androgenización sobre el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal.....	103
DISCUSIÓN	106

CAPÍTULO III: Regulación de la expresión de las subunidades del receptor GABA_B hipofisario por GABA y por esteroides gonadales

INTRODUCCIÓN	114
MATERIALES Y MÉTODOS	116
Cultivos celulares	116
Obtención del ARN.....	117
Expresión del ARNm de la subunidades RGABA _{B1} y RGABA _{B2} por RT-PCR	117
<i>PCR de ADNc del RGABA_{B2}</i>	117
Radioinmunoensayos de hormonas peptídicas.....	120
<i>RIA de LH y FSH</i>	120
<i>RIA de PRL</i>	120
Análisis estadísticos	120
RESULTADOS	122
Expresión del ARNm de las subunidades RGABA _{B1} y RGABA _{B2} en células adenohipofisarias de ratas hembras y machos estimuladas con GABA.....	122
Efecto del GABA sobre los niveles de hormonas hipofisarias	125
Expresión del ARNm de las subunidades RGABA _{B1} y RGABA _{B2} del receptor GABA _B en células adenohipofisarias de ratas hembras y machos estimuladas con esteroides gonadales	127
Efecto de los esteroides gonadales sobre los niveles de hormonas hipofisarias	129
DISCUSIÓN	132

CAPÍTULO IV: Receptores GABA_B en células adenohipofisarias: mecanismo de acción acoplados a efectos endócrinos.....

INTRODUCCIÓN	138
MATERIALES Y MÉTODOS	139
Animales	139
Células anterohipofisarias	139
Cultivo en monocapa de células adenohipofisarias	139
Mediciones de Ca ²⁺ intracelular.....	140
Determinaciones de PRL y LH en el medio	143
Mediciones del cAMP intracelular por RIA	143
Drogas	145
Análisis estadísticos	145

RESULTADOS.....	147
Efecto de la toxina de Pertussis sobre la inhibición de la secreción de PRL inducida por el Baclofen en células de la pituitaria anterior.....	147
Acción del Baclofen sobre el incremento de los niveles intracelulares de AMPc inducido por Forskolina en células de la pituitaria anterior.....	149
Acción del Baclofen sobre los niveles intracelulares de Calcio en las células de la pituitaria anterior.....	150
El pretratamiento con PTX suprime la inhibición sobre los niveles intracelulares de Calcio inducida por el Baclofen.....	151
Efecto de los agentes bloqueantes de canales de Potasio sobre la disminución en los niveles de Calcio intracelulares inducida por Baclofen	152
Efecto de inhibidores de Canales de Calcio Sensibles a Voltaje tipo L sobre la disminución del Ca^{2+} intracelular inducida por Baclofen	153
Efecto del Baclofen sobre el incremento en el Calcio intracelular inducido por administración de KCl	155
Efecto del pretratamiento con Baclofen sobre la inhibición del influjo de Calcio inducida por Dopamina.....	156
DISCUSIÓN	158
DISCUSIÓN GENERAL	164
CONCLUSIONES GENERALES	170
BIBLIOGRAFÍA	174

INTRODUCCIÓN GENERAL

SISTEMA NEUROENDÓCRINO

La supervivencia del individuo depende de su capacidad adaptativa a cambios ambientales. En la integración con el medio exterior, y por supuesto entre las células de un mismo organismo, los sistemas nervioso y endócrino juegan papeles fundamentales. Es fácilmente comprensible la importancia que adquieren las relaciones entre dichos sistemas de integración: el sistema nervioso controla la actividad endócrina y las hormonas regulan la función nerviosa. Debido a sus interacciones los individuos superiores pueden mantener la constancia del medio interno (homeostasis) ante variaciones del medio externo (Halasz, 2000).

El estudio de la interacción sistema nervioso-hormonas dio origen a la neuroendocrinología. El paradigma de esta integración está dado por dos estructuras muy relacionadas: el hipotálamo y la hipófisis. Ellas establecen una conexión anatómica y fisiológica continua, interactiva y altamente eficiente entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema endócrino (Page, 1988).

Organización anátomo-funcional del hipotálamo

El hipotálamo es quien monitorea el medio interno (estado metabólico, hormonal, etc.) y externo (luz, temperatura, presencia del sexo opuesto, etc.) y ha claramente evolucionado como principal centro integrador de los estímulos que recibe de otras áreas del SNC, así como de los niveles de hormonas circulantes (Levine, 2000).

El hipotálamo, principalmente de origen diencefálico, se extiende bajo el tálamo y comprende la zona gris que rodea ventralmente al tercer ventrículo. Su límite anterior es el plano frontal que pasa por la comisura anterior, y su límite posterior, el plano que

pasa por detrás de los cuerpos mamilares, los cuales funcionalmente pertenecen al sistema límbico. Lateralmente limita con el tálamo ventral, el ansa peduncularia, la cápsula interna, el globus pallidus y el tracto óptico. La zona lateral del hipotálamo es rica en fibras nerviosas pero su celularidad no se agrega en núcleos definidos (Silverman and Pickard, 1983). Ventralmente adquiere una disposición infundibular que se continúa con el tallo hipofisario. Entre el *infundibulum* y el tallo, hay una pequeña prominencia de gran relevancia fisiológica, la eminencia media del *tuber cinereum* (EM). Las neuronas hipotalámicas en algunos casos constituyen núcleos bien definidos y, en otros, acúmulos de límites poco netos, existiendo variaciones según la especie estudiada.

Esta estructura puede dividirse en cuatro regiones principales, organizadas rostro-caudalmente en: área preóptica, hipotálamo anterior, hipotálamo medio y hipotálamo posterior (Palkovits, 2000). Los núcleos más relevantes de las mismas son:

- *área preóptica* (APO): el núcleo preóptico medial, con neuronas secretoras de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) que proyectan hacia la EM en la mayoría de los mamíferos. Esta área incluye al núcleo dimórfico sexual.
- *hipotálamo anterior* (HTA): el núcleo periventricular (proyecta a EM), el supraóptico y el paraventricular (proyecta fundamentalmente hacia el lóbulo neural) y el supraquiasmático (reloj biológico para las regulaciones neuroendócrinas).
- *hipotálamo medio* (HTM): en él se reconocen tres partes: el hipotálamo medio basal (HTMB), el dorsal (HTMD) y el lateral (HTML). Esta región incluye a la EM y a los núcleos arcuato (NA), ventromedial (NVM) y dorsomedial (NDM) que proyectan hacia EM.
- *hipotálamo posterior* (HTP): los cuerpos mamilares. El núcleo premamilar ventral proyecta hacia EM.

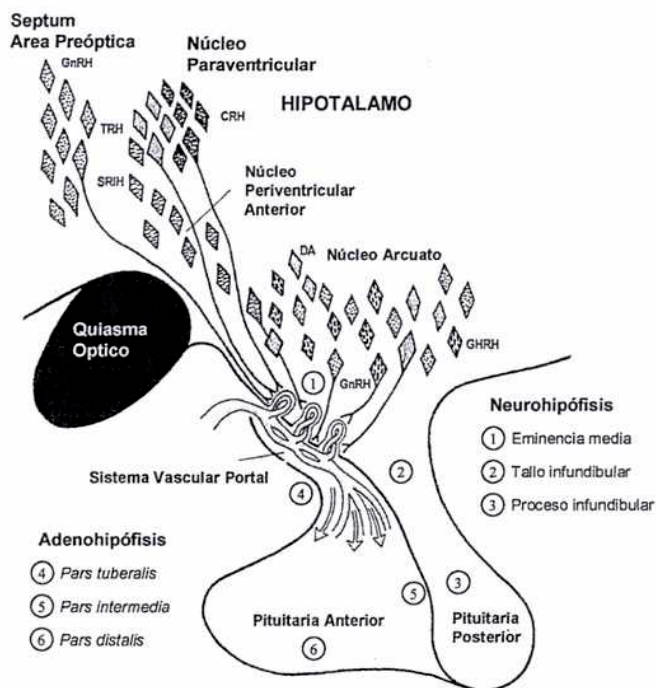
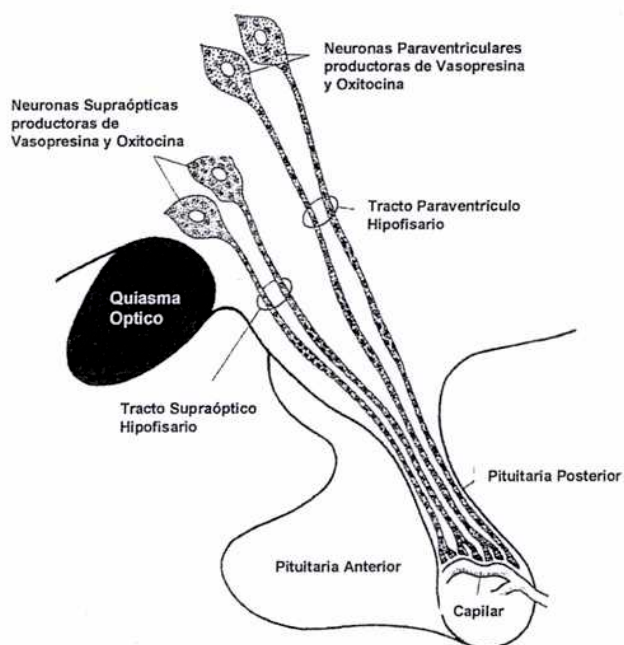
Aunque embriológicamente el área preóptica no forma parte del hipotálamo, dado que se origina en el telencéfalo, funcional y topográficamente sí forma parte del hipotálamo neuroendócrino.

El hipotálamo utiliza una compleja regulación de la actividad neuronal de sus núcleos para llevar a cabo su función de procesamiento de la información entrante. En ella intervienen neuronas que actúan mediante una notable diversidad de neurotransmisores aminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, opiáceos, peptidérgicos, gabaérgicos, aminoacídicos, etc. (Malven, 2000). De manera que las drogas que afecten la síntesis, almacenamiento, *turnover* o acción de estos neurotransmisores, pueden potencialmente alterar las funciones neuroendócrinas.

Las conexiones neurales del hipotálamo son múltiples y complejas siendo en su mayoría recíprocas, formando circuitos dentro de los núcleos celulares hipotalámicos, entre varios núcleos y áreas hipotalámicas, como también entre regiones hipotalámicas y diferentes regiones extrahipotalámicas (Palkovits, 2000; Halasz, 2000). Se ha descrito un gran número de vías aferentes que comunican diversas regiones del SNC con el hipotálamo, incluyendo el complejo amigdalóide, hipocampo, septum, tálamo, ganglio basal, corteza, tallo cerebral inferior, médula espinal, retina, bulbo olfatorio, a través de los cuales recibe gran cantidad de aportes sensoriales. Además, habría conexiones neuronales aferentes y eferentes entre el hipotálamo y otros órganos fuera del SNC, como ser la glándula adrenal y las gónadas.

Las conexiones del hipotálamo más conocidas son las vías eferentes que lo comunican con la hipófisis. Por un lado los tractos supraóptico y paraventriculo hipofisarios que atraviesan la zona interna de la EM llegando a la hipófisis posterior; y por otro, fibras que se originan en APO, núcleo paraventricular, núcleo periventricular

anterior y NA y llegan a la zona externa de la EM, en estrecho contacto con los capilares del plexo portal primario superior (en detalle más adelante).



Esquema superior: inervación hipotalámica de la hipófisis posterior.
Esquema inferior: mecanismos neurohumorales que controlan la función de la hipófisis anterior.
Tomados de B. Halász (Halasz, 2000).

La información entrante a través de vías humores y neurales es registrada, analizada e integrada en neuronas hipotalámicas donde se elabora una respuesta que en parte es canalizada hacia otros centros del encéfalo y en parte hacia la hipófisis, traduciendo en cambios, si fueran necesarios, en las secreciones hormonales, estado comportamental y actividad autónoma (Levine, 2000).

Así, algunas neuronas hipotalámicas responden liberando, de manera pulsátil al sistema porta hipofisario, diferentes neurohormonas que regulan la síntesis, almacenamiento y secreción de las hormonas tróficas adenohipofisarias. Estas neurohormonas se denominan hormonas liberadoras o inhibitorias según su propiedad de estimular o inhibir la actividad secretoria de la hipófisis respectivamente. La mayoría de estas neurohormonas son oligo o polipéptidos sintetizados en núcleos hipotalámicos discretos (Fink, 2000; Arimura, 2004), si bien algunas son directamente neurotransmisores. En una misma neurona o núcleo pueden sintetizarse y coexistir diferentes tipos de neuropéptidos. Las neurohormonas hipofisotróficas más conocidas son: GnRH, la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), la hormona liberadora de tirotrófina (TRH), la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), la hormona inhibitoria de la liberación de hormona de crecimiento (somatostatina o SRIH), la neurohormona inhibitoria de la liberación de prolactina (PRL): la dopamina (DA), el ácido γ aminobutírico (GABA), que también inhibe la secreción de PRL y otras hormonas hipofisarias. Estas neurohormonas llegan a la adenohipófisis y actúan sobre sus células blanco regulando su función. Normalmente, la concentración de estas sustancias es mucho más elevada en la sangre portal que en la circulación periférica.

Organización anátomo-funcional de la hipófisis

La hipófisis es un cuerpo pequeño, bilobulado situado en la base del cerebro, yaciendo sobre una depresión en la base del cráneo llamada la silla turca del esfenoide. Esta glándula está compuesta por dos estructuras embriológica y funcionalmente diferentes, la **neurohipófisis** y la **adenohipófisis**, que se encuentran adheridas en todos los cordados (Page, 1988).

La **neurohipófisis** se origina a partir de una evaginación del piso diencefálico del tercer ventrículo (ectodermo neural) y se diferencia en tres subdivisiones:

- la eminencia media del *tuber cinereum* (*infundibulum*): estructura de gran importancia para la integración del eje hipotálamo-adenohipofisario. Es el camino final común de salida del SNC al sistema endócrino, particularmente hacia la hipófisis anterior. Contiene numerosos axones, terminales nerviosas y células ependimarias especializadas, pero está casi desprovista de cuerpos neuronales. Los neuropéptidos que llegan allí provienen de distintas regiones del cerebro, principalmente del hipotálamo, siendo el origen de la mayoría de las fibras extrahipotalámicas el tallo cerebral inferior. Simplificando la compleja estructura de la EM podemos diferenciar: una zona ependimal que separa el fluido extracelular de la EM del fluido ventricular del III ventrículo, una capa interna con fibras que surgen casi exclusivamente de neuronas hipotalámicas y que terminan en la hipófisis posterior (tracto hipotálamo-hipofisario) y una capa externa donde varios núcleos hipotalámicos descargan sus productos al sistema porta hipofisario superior.
- el tallo infundibular, constituido fundamentalmente por axones que conforman los tractos supraóptico-hipofisario y paraventrículo-hipofisario. Estos se dirigen al proceso infundibular y al lóbulo intermedio. Además contiene terminales axónicas

secretoras de neurohormonas liberadoras e inhibidoras de hormonas hipofisotróficas (TRH, SRIF, GnRH, CRH y neurotensina).

- el proceso infundibular (lóbulo neural *o pars nervosa*): cuyos principales elementos son terminales nerviosas, axones, células de la glía llamadas pituicitos y capilares fenestrados, careciendo de cuerpos neuronales. Las terminales nerviosas provienen de los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular que secretan las hormonas peptídicas oxitocina y vasopresina con sus neurofisinas asociadas (I y II, respectivamente). Acá también termina el tracto dopaminérgico túbero-hipofisario y otros sistemas conteniendo diferentes neurotransmisores, como ser norepinefrina (NE) ó epinefrina (E), GABA, TRH, somatostatina, dinorfina, sustancia P, etc.

La **adenohipófisis** es la porción glandular del cuerpo hipofisario. Esta se origina de tejido ectodérmico que evagina del *stomadeum* de la boca primitiva: la bolsa de Rathke. Esta glándula está integrada por tres estructuras:

- la *pars tuberalis* (adherida al *infundibulum* y al tallo infundibular superior, ubicada en la base del cerebro), consta de células epiteliales glandulares -en la rata predominantemente gonadotropos-, células intersticiales que las rodean, células ciliadas, elementos de tejido conectivo y varios capilares fenestrados.
- la *pars intermedia* (ó lóbulo intermedio, adherido al proceso infundibular y al tallo infundibular inferior, ubicado dentro de la silla turca), prominente en varias especies de mamíferos, incluyendo la rata, pero ausente en otras, como los humanos adultos. Constituida por células epiteliales endócrinas denominadas melanotropos secretoras de α - y β -MSH (hormona estimuladora de melanocitos). Si bien es poco vascularizada posee un espacio extracelular bien desarrollado que se comunica con el bolsillo hipofisario y con el espacio extracelular del lóbulo neural y de la *pars distalis*.

Es regulada por señales químicas provenientes de estas dos estructuras o por contacto neural directo a través de axones, que hacen contacto sináptico con las células epiteliales.

- la *pars distalis* está compuesta por: células epiteliales glandulares, (funcionalmente específicas), un estroma de tejido conectivo, células no diferenciadas, células folículo-estrelladas y varios capilares fenestrados. Estas células epiteliales no están innervadas y se clasifican por sus productos secretorios específicos en: somatotropos (células secretoras de GH: hormona de crecimiento), lactotropos (células secretoras de PRL: prolactina), tiotropos (células secretoras de TSH: tiotropina o hormona estimuladora de la tiroides), corticotropos (células secretoras de ACTH: hormona corticotrópica o corticotropina y péptidos relacionados) y gonadotropos (células secretoras de gonadotrofinas: LH -hormona luteinizante- y FSH -hormona folículo estimulante). Existe un grupo de células que no se tiñen por inmunohistoquímica y se la llaman células desnudas; no se sabe si son células indiferenciadas o si producen hormonas aún no identificadas. Además una célula hipofisaria puede sintetizar más de una hormona (por ejemplo los corticotropos además de ACTH contienen productos de clivaje de la pro-opiomelanocortina –POMC- y la mayoría de los gonadotropos contienen LH y FSH). Existen también células que secretan PRL y GH denominadas somatomatotropos. Es importante señalar que la composición celular de la pituitaria no es estática existiendo cambios fisiológicos en el número de células de cada tipo celular; por ejemplo: los lactotropos pueden duplicar su número durante la lactancia y regresar abruptamente al desaparecer el reflejo de succión.

Cabe aclarar que en el proceso de disección, a la hipófisis se la divide comúnmente en una porción anterior, constituida por la *pars distalis* y la *pars tuberalis* (lóbulo o

hipófisis anterior), y una porción posterior, compuesta en la rata, especie utilizada en nuestros trabajos de experimentación, por el lóbulo neural y el lóbulo intermedio adyacente (lóbulo neurointermedio o posterior).

Relación neurohemal entre el hipotálamo y la hipófisis.

La hipófisis de los mamíferos se comunica con el SNC mediante conexiones vasculares y nerviosas. Mientras que el control del hipotálamo sobre la secreción hormonal del lóbulo neurointermedio es principalmente nervioso, la regulación hipotalámica de la secreción de hormonas del lóbulo anterior es fundamentalmente endócrina mediante los sistemas portales hipofisarios (Halasz, 2000).

La adenohipófisis no recibe un suministro arterial directo. La sangre destinada para la adenohipófisis pasa a través de la neurohipófisis y la EM y llega a la glándula a través de una organización vascular llamada porta, caracterizada por la secuencia de: capilar-vaso-capilar, siendo los capilares fenestrados (Page, 1988; Palkovits, 2000).

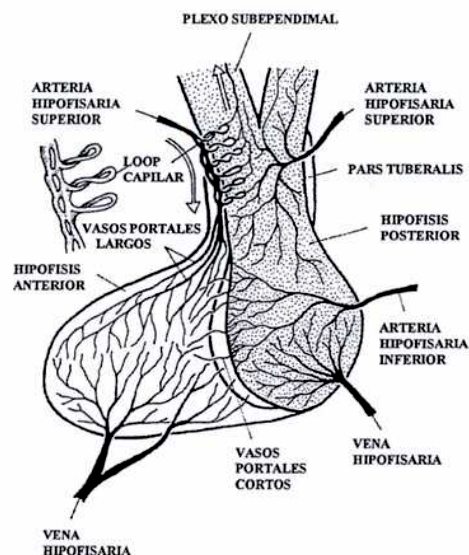
Así, el lecho capilar neurohipofisario se extiende desde la EM hasta el lóbulo neural y es abastecido por las arterias hipofisarias superiores (irrigan la EM), las arterias hipofisarias inferiores (irrigan el lóbulo neural) y por las arterias hipofisarias medias (irrigan al tallo infundibular) las cuales surgen de distintos segmentos de las arterias carótidas internas.

Los axones que terminan en el lóbulo neural secretan sus productos en el espacio perivascular. Las arterias hipofisarias inferiores forman en la neurohipófisis una red de capilares que son drenados principalmente hacia la circulación sistémica. La *pars distalis* adyacente tiene una aferencia vascular mediante los vasos portales cortos que surgen del plexo capilar primario del lóbulo neural. Estos vasos se arborizan en la

adenohipófisis en los capilares del plexo secundario del sistema porta hipofisario que, por su localización, se denomina inferior o corto. Las neurohormonas liberadas en el lóbulo neural tienen acceso a este epitelio glandular además de a la *pars intermedia*.

Por otro lado, la principal irrigación de la adenohipófisis proviene de las arterias hipofisarias superiores que se capilarizan en la EM constituyendo el plexo capilar primario del sistema porta hipofisario superior o largo. A la capa externa de la EM llegan terminales axónicas que se originan de neuronas neurosecretorias estableciendo un estrecho contacto con estos capilares donde liberan sus contenidos. A partir de estos capilares se forman los vasos portales largos, que descienden por el tallo hipofisario hacia la *pars tuberalis* y la *pars distalis* donde se arborizan formando el plexo capilar secundario de este sistema porta hipofisario. Así establece contacto con las células epiteliales de la glándula. Los factores hipotalámicos hipofisotróficos dejan la sangre para interactuar con sus receptores específicos y así regular la secreción hormonal.

De ambos sistemas porta hipofisarios salen venas hipofisarias que drenan en los senos cavernosos, alcanzando así las hormonas liberadas la circulación general y sus órganos blanco distantes.



Esquema del sistema vascular portal hipofisario, tomado de B. Halász (Halasz, 2000)

Si bien el sentido principal de la circulación en el complejo hipotálamo-hipofisario es descendente, se ha descrito la existencia de vasos portales profundos en los cuales la sangre parece fluir desde la *pars distalis* hacia la EM. De esta manera, un flujo retrógrado llevaría hormonas adenohipofisarias a actuar negativamente sobre la secreción de las hormonas hipotalámicas (retroalimentación corta) según el estado hemodinámico del lecho vascular (Palkovits, 2000).

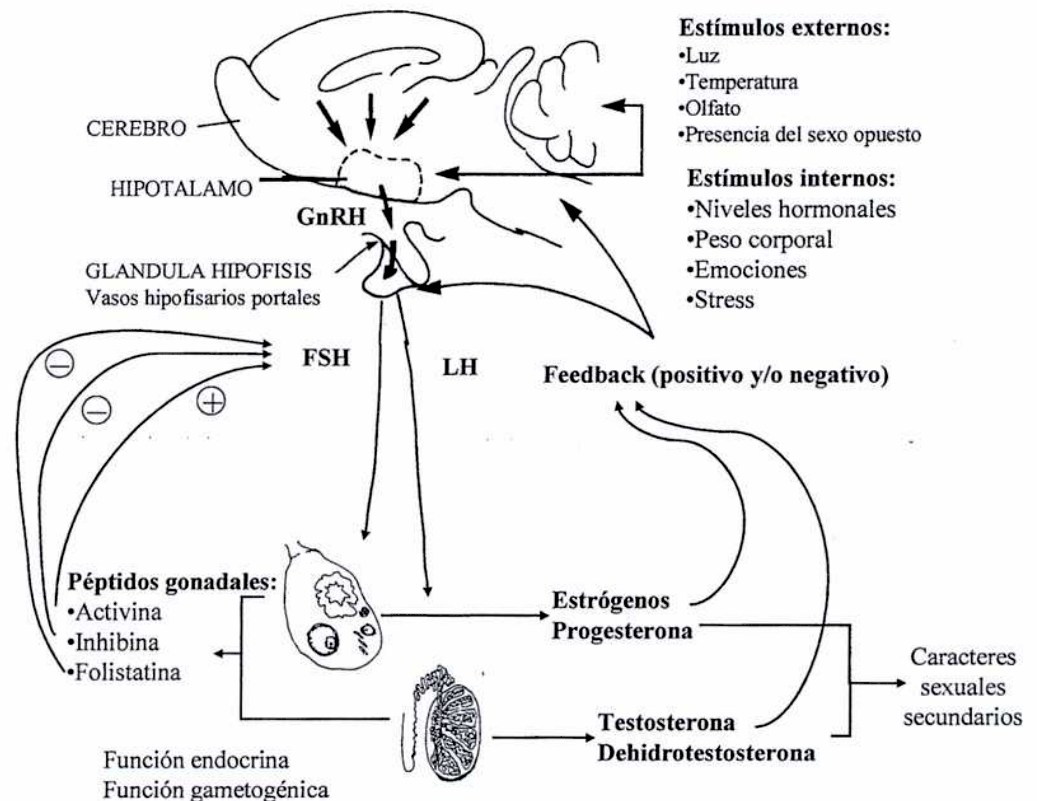
Cabe señalar que la EM es una estructura que está fuera de la barrera hematoencefálica lo cual la hace susceptible a la acción de fármacos administrados por vía sistémica.

REGULACIÓN DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISARIO

El sistema nervioso, a través del control hipotalámico de la hipófisis, regula las funciones tiroideas, adrenocorticales y gonadales y modifica múltiples actividades fisiológicas, tales como reproducción: crecimiento y desarrollo, balance energético, del agua y electrolitos, respuesta a estrés y función inmune. Recíprocamente, la actividad hipotalámica y las hormonas (tanto hipofisarias como provenientes de otras glándulas) influyen en el desarrollo y la función cerebral modificando la actividad neural y las secreciones neurohormonales, y regulando actividades cerebrales superiores como la conducta sexual, homeostasis energética, termorregulación y sueño-vigilia (Levine, 2000).

Las hormonas de las glándulas endócrinas blanco ejercen una acción de retroalimentación (larga) sobre la secreción de las hormonas producidas por la adenohipófisis actuando directamente sobre esta glándula y sobre estructuras del SNC, fundamentalmente sobre el hipotálamo.

Por otra parte las hormonas hipofisarias como también las hormonas hipotálamicas hipofisotróficas ejercen una acción de retroalimentación directa (llamadas corta y ultracorta respectivamente) sobre estructuras del SNC involucradas en el control de la secreción de hormonas adenohipofisarias. De esta manera se constituyen mecanismos de retroalimentación largos, cortos y ultracortos, positivos y negativos, tanto a nivel central como hipofisario (Fink, 2000).



Esquema de la regulación hipotálamo-hipofiso-gonadal

Además de las señales periféricas y centrales, la función hipofisaria está regulada por interacciones intraglandulares autocrinas y paracrinas (Ray and Melmed, 1997; Schwartz et al., 1998). La distribución de los distintos tipos de células dentro de la glándula no es al azar, sino que sigue una histoarquitectura definida, base estructural de

esta organización funcional horizontal en la cual las células pituitáricas ejercen un control mutuo de su función y diferenciación.

Nos centraremos en las hormonas adenohipofisarias involucradas en la reproducción.

Regulación de la secreción de gonadotrofinas

La regulación de la secreción de LH y FSH es muy compleja; en ella participan el SNC, la adenohipófisis y las gónadas (Fink, 1988; Fink, 2000).

El SNC mediante la secreción pulsátil del decapeptido GnRH regula la función gonadotrófica al modular la síntesis y liberación de gonadotrofinas así como la capacidad de respuesta del gonadotropo. Esta secreción es el resultado de la integración de múltiples informaciones que alcanzan el SNC, algunas provenientes del eje reproductor, y otras del medio interno o externo. La neurona decapeptidérgica integra esta información y responde con pulsos de la neurohormona GnRH.

En contraste con otras neuronas peptidérgicas hipotalámicas, las neuronas GnRH no forman núcleos bien definidos. Se ha demostrado que tienen capacidad pulsátil intrínseca y que se encuentran sincronizadas, por lo que se postula la existencia de una red neuronal que permite dicha sincronización. La secreción de GnRH en el cerebro de rata es controlada por dos centros ubicados en dos áreas distintas del hipotálamo:

- el centro tónico, compuesto por neuronas GnRH del NA y del NVM en el HTMB (presente en ambos sexos). Responsable de la secreción pulsátil.
- y el centro cíclico, compuesto por neuronas GnRH del área supraquiasmática (HTA) y del APO (presente sólo en hembras). Responsable de la secreción cíclica.

Dado el papel crucial que tiene la liberación de GnRH para la reproducción en mamíferos, es de esperarse la existencia de una red compleja de sistemas de

neurotransmisores para el control de su secreción. La liberación hipotalámica de GnRH está regulada por neuronas presentes en diferentes regiones del cerebro (sistemas límbico y olfatorio, cortex visual, etc.), cuyas terminales finalizan en el hipotálamo. Dentro de los neurotransmisores que participan en este control están: el GABA y péptidos opioides endógenos que son inhibitorios de la liberación de GnRH; la E, NE, neuropéptido Y (NPY) y glutamato que la incrementan, mientras que DA y serotonina pueden ser inhibitorias o estimuladoras dependiendo del estado endócrino del animal. La neurona decapeptidérgica presenta también receptores para GnRH, permitiendo un mecanismo de retroalimentación ultracorto. Así la secreción de GnRH hipotalámica es el resultado de la integración de todos los estímulos facilitadores e inhibitorios, modulándose preferentemente según los niveles de estrógenos y progesterona circulantes.

El GnRH, liberado de manera pulsátil de las terminales nerviosas en la EM y transportado por el sistema porta hipofisario a la pars distalis, estimula la secreción de hormonas hipofisarias LH y FSH. Ambas gonadotrofinas viajan a través de la circulación general hasta las gónadas en donde ejercen su acción trófica tanto endócrina como gametogénica. Los esteroides gonadales secretados por los ovarios, estrógenos y progesterona (P_4), y por los testículos, testosterona (T) y dehidrotestosterona (DHT), además de desarrollar y mantener los caracteres sexuales secundarios actúan sobre el encéfalo y la hipófisis anterior regulando la secreción hormonal, mientras que los péptidos gonadales como la inhibina actúan a nivel hipofisario regulando la síntesis y liberación de FSH.

Tanto los estrógenos como la P_4 estimulan o inhiben la liberación de gonadotrofinas dependiendo de la concentración y duración de la exposición de la hipófisis a los esteroides, y de las circunstancias fisiológicas o experimentales.

Retroalimentación negativa de gonadotrofinas en hembras

Los estrógenos ejercen un efecto inhibitorio tanto en el hipotálamo como en la hipófisis. La inhibición de la secreción de FSH y LH ocurre a bajos niveles de estrógenos pero es más completa a altos niveles. La P_4 , a concentraciones elevadas, inhibe a FSH y LH principalmente a nivel hipotalámico. Además LH regularía negativamente la secreción de ambas gonadotrofinas por transporte retrógrado desde la hipófisis anterior hacia el hipotálamo, donde las neuronas GnRH poseen receptores para dicha hormona.

Retroalimentación positiva de gonadotrofinas en hembras

Las hormonas gonadales esteroideas también ejercen un efecto positivo sobre la secreción de gonadotrofinas. La retroalimentación positiva es el evento previo a la inducción del pico de LH, requerido para desencadenar la ovulación, y está disparada por un incremento importante y sostenido en los niveles plasmáticos de estrógenos. La P_4 o alguno de sus metabolitos participarían en el desencadenamiento del pico de FSH en la mitad del ciclo. Además, la P_4 , a bajas concentraciones, estimula la liberación de LH, pero sólo luego de una prolongada exposición de la hipófisis a los estrógenos. Después de la ovulación predomina nuevamente el efecto inhibitorio de los esteroides gonadales y se reanuda el ciclo.

En general se acepta que las neuronas GnRH no tienen receptores de estradiol (E_2), por lo que sus efectos sobre la liberación de GnRH por retroalimentación positiva o negativa deben ser mediados por otras neuronas -inhibitorias o excitatorias- que

expresan estos receptores y proyectan hacia las neuronas GnRH. Sin embargo, últimamente se ha demostrado la presencia de receptores de E_2 α y β en neuronas GnRH de origen embrionario, lo que permitiría un efecto directo del esteroide sobre estas neuronas.

Regulación de la secreción de gonadotropinas en machos

En los machos la T también presenta un mecanismo de acción dual sobre la secreción de gonadotropinas. A altos niveles inhibe la secreción de GnRH vía retroalimentación negativa hipotalámica sobre neuronas GnRH por un aumento en el tono opioide, con la consecuente disminución en la síntesis y secreción de ambas gonadotropinas. Pero, por otro lado, aumenta la transcripción y la vida media del ARNm FSH β directamente en el lóbulo anterior lo cual favorece el mantenimiento de la secreción de FSH durante períodos de estímulos de GnRH reducidos, preservando así la maduración de las gametas. Es decir, este mecanismo dual es un medio por el cual la T, cuya síntesis está principalmente controlada por LH, ejerce una retroalimentación negativa reduciendo los niveles LH sin disminuir simultáneamente los niveles circulantes de FSH a valores que pudieran impedir la gametogénesis.

Regulación de la secreción de gonadotropinas por péptidos gonadales

Finalmente, sobre la hipófisis también actúan los péptidos gonadales inhibina, activina y folistatina, quienes modulan selectivamente la liberación de FSH. La inhibina y la folistatina inhiben por mecanismos diferentes su síntesis y secreción mientras que la activina la estimula. Si bien estas hormonas fueron originalmente halladas en gónadas, también son sintetizadas en la hipófisis. Es más, la inhibina que actúa sobre esta glándula es principalmente de origen gonadal a diferencia de la activina y folistatina, que son principalmente de origen local (Dalkin and Marshall, 1997).

Regulación intraglandular de la secreción de gonadotrofinas

En la regulación local de la secreción de gonadotrofinas también participan otros factores sintetizados por los mismos gonadotropos así como por los somatotropos, lactotropos, tirotropos y las células folículo estrelladas. Entre estas señales intraglandulares que modulan LH y/o FSH están la galanina, angiotensina II (AtII), interleuquina 6 (IL₆), el GnRH y el NPY (Schwartz, 2000).

Regulación de la secreción de prolactina

La síntesis y liberación de prolactina (PRL) son el resultado de múltiples señales procedentes de distintos orígenes, encefálico -a través del hipotálamo y la *pars nervosa*-, gonadal -a través de los esteroides sexuales- y adenohipofisario -a través de factores locales- que convergen sobre el lactotrofo. Los estímulos fisiológicos más importantes en la secreción de PRL son la succión, el estrés, el coito y altos niveles de esteroides ováricos, principalmente los estrógenos.

Regulación hipotalámica de la secreción de PRL

En contraposición al resto de las hormonas adenohipofisarias, la secreción de PRL en los mamíferos, se encuentra predominantemente bajo un control inhibitorio del cerebro. La principal neurohormona inhibitoria es la DA, quien inhibe en los lactotrofos la secreción de PRL a través de sus receptores tipo D2. Esta catecolamina es sintetizada por tres sistemas neuronales del HTMB, los sistemas dopaminérgicos tuberohipofisario (THDA) y tuberoinfundibular (TIDA), ambos situados en el NA, y el sistema dopaminérgico periventricular-hipofisario (PHDA), presente en el núcleo periventricular. El sistema TIDA, el más importante en la regulación de la secreción basal de prolactina, proyecta directamente hacia EM, llegando la DA a la hipófisis

anterior por el sistema porta hipofisario superior. En cambio los sistemas PHDA y THDA proyectan hacia el lóbulo posterior donde descargan la DA que llega a la pituitaria anterior por el plexo porta hipofisario corto (Freeman et al., 2000).

Si bien la DA regula la prolactinemia en condiciones basales, existen otros factores hipotalámicos inhibidores de la secreción de PRL con efectos más débiles que actúan directamente a nivel hipofisario y se manifiestan bajo ciertas situaciones experimentales y clínicas como ser el GABA y la somatostatina (Libertun et al., 1979; Freeman et al., 2000). Es más, la PRL en sí misma tiene un efecto inhibitorio sobre su propia secreción. Las neuronas del sistema TIDA poseen receptores para esta hormona, que estarían asociados positivamente a su liberación (Arbogast and Voogt, 1997; Lerant and Freeman, 1998). Así la PRL, por circulación retrógrada aumentaría la secreción hipotalámica de DA. Este mecanismo de retroalimentación negativo corto permitiría ajustar el tono dopaminérgico de acuerdo a los niveles plasmáticos de PRL.

A nivel central el tono dopaminérgico también está regulado por neuromoduladores que modifican directa o indirectamente la actividad del sistema TIDA. Los neurotransmisores que activan a este sistema, disminuyendo así la prolactinemia son glutamato, acetilcolina, AtII y NPY, mientras que los que inhiben dicha actividad son GABA, opiáceos y galanina.

El hipotálamo también sintetiza neurohormonas que actúan a nivel hipofisario estimulando la secreción de PRL. Estas se ponen de manifiesto en situaciones, en las que los niveles altos de PRL circulante no se podrían justificar con la neta disminución del tono dopaminérgico, como ser en la lactancia o el estrés. Las neurohormonas estimuladoras de la secreción de PRL aceptadas como de mayor relevancia fisiológica son: la oxitocina, el TRH y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Neill, 1988).

Regulación de la secreción de PRL por esteroides gonadales

Los esteroides sexuales también están involucrados en la regulación la secreción de PRL. Los estrógenos ejercen el control periférico más importante, promoviendo un aumento de la prolactinemia tanto a nivel hipotalámico como hipofisario. En el cerebro estimulan la liberación de factores liberadores de PRL a la vez que inhiben al sistema TIDA. En la adenohipófisis actúan directamente sobre los lactotrofos alterando su sensibilidad a factores reguladores de PRL, por ejemplo: incrementan la expresión del receptor de TRH y disminuyen los de DA, y estimulando la síntesis de PRL. En cuanto a la P_4 , ésta presenta un efecto dual sobre la prolactinemia, mientras que la T básicamente la incrementa (Neill, 1988).

Regulación intraglandular de la secreción de PRL

Finalmente existe una regulación local más fina de la secreción de PRL la cual se establece a través de factores sintetizados por las mismas células lactotropas y por las células gonadotropas, somatotropas, corticotropas y foliculo estrelladas. Entre las señales intraglandulares que modulan a la PRL, la galanina, el TRH, AtII, el VIP, el GABA y la DA son las de mayor relevancia fisiológica, siendo algunas inhibitorias y otras estimulatorias (Deneff, 2003).

DIFERENCIACIÓN SEXUAL Y ONTOGENIA

Durante el desarrollo embrionario, la generación temporal y espacial de los diferentes tipos celulares a partir de precursores ocurre como una secuencia de estados progenitores sucesivos cuya proliferación, supervivencia y destino celular elegido están controlados por moléculas ambientales y celulares regulatorias. De esta manera, el desarrollo armonioso del individuo, tanto durante la embriogénesis como durante su

maduración postnatal, no sólo requiere del curso preciso de programas genéticos, sino que también depende de influencias adecuadas aportadas por varios procesos de señalización epigenéticos. Así, en el transcurso de este largo proceso que va desde la fecundación hasta la adultez, se observa una expresión génica altamente regulada. Esto se manifiesta a través de la expresión diferencial de genes que puede ser de tipo constitutiva, donde los niveles de las proteínas codificadas se mantienen constantes; de tipo transiente, en la cual la expresión de las proteínas se encuentra asociada a algún/algunos estadio/s de desarrollo específico/s; y finalmente de tipo variable, en la que los niveles de las proteínas se modifican a lo largo del desarrollo y por ende presentan patrones de expresión ontogénicos. A su vez es importante señalar que pueden existir diferencias tanto en los niveles de expresión, en el momento de expresión como en el patrón de expresión de proteínas entre machos y hembras, dando así lugar a la presencia de diferencias asociadas al sexo.

Determinación cromosómica del sexo

El proceso de diferenciación sexual empieza en la fecundación, con el establecimiento del sexo cromosómico. En los mamíferos, la fórmula cromosómica sexual para hembras es XX y para machos, XY. Los cromosomas sexuales y los autosómicos llevan genes que influyen la diferenciación sexual al inducir que la gónada bipotencial se desarrolle como un testículo (presencia del cromosoma Y o del factor determinante de testículo –TDF-) o como un ovario (dos cromosomas X y en ausencia de un cromosoma Y y del TDF). El feto está equipado con los conductos genitales primordiales de hembra y de macho. Al diferenciarse el testículo, aparece la T, su principal producto endócrino. Esta hormona es la responsable de la diferenciación sexual masculina, tanto a nivel central (diferenciación sexual del encéfalo) como

periférico (conductos de Wolf, próstata y genitales externos). El testículo funcional también secreta una “hormona inhibidora del conducto de Müller” que promueve la involución ipsilateral de los mismos, inhibiendo el desarrollo de los conductos femeninos (Conte and Grumbach, 1991).

Diferencias sexuales en la fisiología reproductiva

La diferenciación sexual del cerebro en los mamíferos se manifiesta a través de una expresión diferencial entre machos y hembra de varias funciones controladas por el mismo (Arnold, 1984; Becu-Villalobos et al., 1997; Fitch and Denenberg, 1998). Estas funciones incluyen: comportamiento social y de juego, comportamiento de rol de género, de aprendizaje, postura durante la micción, vocalización, regulación de la toma de comida y del peso corporal. Pero las diferencias funcionales más evidentes entre ambos sexos son aquellas involucradas en la fisiología reproductiva: en sus patrones de secreción de las hormonas hipofisarias y gonadales, comportamiento sexual y capacidad de respuesta a las hormonas gonadales.

Si bien en las ratas hembras y machos, las gonadotrofinas se secretan de manera pulsátil, existen diferencias sexuales en su regulación. Así, las fluctuaciones séricas en LH, FSH y esteroides que las ratas exhiben, desde el nacimiento hasta la pubertad e influyen profundamente en el sistema reproductivo, son diferentes en ambos sexos. Se ha propuesto que estas diferencias sexuales y ontogénicas en la secreción y regulación de gonadotropinas surgen de cambios que ocurren a nivel hipofisario e hipotalámico. La organización sexual del hipotálamo por esteroides gonadales, juega un rol determinante en esta regulación al condicionar a diferentes componentes neurales. Por ejemplo los sistemas serotoninérgicos, opiodes, dopaminérgicos, noradrenérgicos y gabaérgicos

varían a medida que el animal se desarrolla en forma diferencial entre machos y hembras, afectando así la síntesis y secreción de GnRH y generando los patrones característicos de cada sexo (Becu-Villalobos et al., 1997).

Así las hembras adultas se caracterizan por una secreción hormonal cíclica, ovulación cíclica y comportamiento sexual cíclico. La liberación fásica de LH y FSH que ocurre periódicamente, como consecuencia del feedback positivo de los estrógenos ováricos sobre las neuronas GnRH y sobre la sensibilidad hipofisaria, provoca la ovulación. En cambio los machos no presentan un feedback positivo de las hormonas sexuales sobre el GnRH, exhibiendo un patrón de secreción tónico de las hormonas hipofisarias y gonadales, y poseen la capacidad de aparearse generalmente en cualquier momento. Se postula que la desintegración del patrón cíclico en el macho ocurre tempranamente en el período perinatal. Los esteroides sexuales actuarían en el HTA y el APO de los machos, promoviendo la desaparición del centro cíclico y bloqueando así la secreción de picos preovulatorios de gonadotrofinas inducidos por esteroides gonadales.

Proceso de diferenciación sexual del SNC: marco temporal y factores intervinientes

El primer dimorfismo sexual anatómico descrito en el cerebro, fue el ahora llamado núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica (NSD-APO), cuyo volumen es varias veces más grande en ratas adultas machos que en hembras (Gorski et al., 1978; Gorski et al., 1980). Esta, como otras diferencias sexualmente dimórficas observadas en conexiones neuronales y estructuras cerebrales, es el resultado del proceso de diferenciación sexual del cerebro. Este proceso ocurre vía la acción irreversible de las hormonas gonadales durante un período sensible (Arnold, 1984; Tobet and Hanna,

1997). En las ratas este período comienza prenatalmente, unos días antes del nacimiento, y termina postnatalmente, aproximadamente a los 30 días de vida. La adecuada masculinización requiere la exposición del SNC en desarrollo a un pico de T secretado por los testículos el día 18 de gestación que luego se completa con la exposición del SNC, ahora sensibilizado a andrógenos, a un segundo pico de T en el día de nacimiento, completándose esta diferenciación alrededor del día 10 en el macho.

El cerebro de las crías hembras está protegido de la masculinización frente a los altos niveles de estrógenos maternos circulantes durante el período crítico, por la presencia de una proteína plasmática ligadora de estrógenos llamada α -feto proteína (AFP) (Raynaud et al., 1971). Esta proteína une los estrógenos circulantes, pero no los andrógenos, y así aparentemente previene que los primeros entren libremente al SNC en las hembras impidiendo su acción de *imprinting* en el cerebro femenino, además de conservar niveles vitales de estrógenos, cruciales para el desarrollo del cerebro. Las evidencias sugieren que la AFP se expresa en el mismo marco de tiempo durante el cual los andrógenos ejercen sus efectos masculinizantes, siendo los niveles máximos en el día 18 de gestación y declinando hacia el día 7 postnatal, cuando su síntesis se apagaría (Ali and Sahib, 1983). En la rata, los ovarios se vuelven activos alrededor del día 7 postnatal (Weniger et al., 1993), momento en que comenzarían los efectos feminizantes de los estrógenos ováricos, que terminarían aproximadamente el día 30 (Fitch and Denenberg, 1998).

Originalmente se proponía que los efectos diferenciadores de los andrógenos eran mediados por su conversión intracelular a estrógenos, verdaderos efectores finales de este proceso. Esta reacción es mediada por la enzima aromatasa. Hoy se sabe que no todos los efectos diferenciadores de la T pueden ser explicados por aromatización y que

los andrógenos en sí mismos también juegan un papel importante en el proceso de diferenciación sexual del cerebro. Es más, andrógenos diferentes pueden ejercer efectos masculinizantes en diferentes regiones y en diferentes momentos del desarrollo pudiendo ser metabolizados de una forma a otra antes de actuar a nivel celular (Fitch and Denenberg, 1998). Por lo tanto, el proceso de diferenciación sexual involucra influencias estrogénicas y androgénicas independientes sobre distintos procesos de desarrollo (Arnold, 1984).

Así los andrógenos ya sean de origen testicular en el macho normal o por inyecciones en las hembras, actuando directamente y/o vía aromatización, controlan el desarrollo masculino, ya que masculinizan y defeminizan permanentemente al animal. El término masculinización se refiere a la adquisición permanente de características típicas de macho, mientras que defeminización se refiere a la pérdida de características típicas de hembras (Dohler, 1991).

Alteraciones en el proceso de diferenciación sexual por tratamientos experimentales

Si las ratas hembras son tratadas con andrógenos o estrógenos durante el período perinatal sensitivo, se masculinizan mostrando una secreción hormonal tónica, ausencia de ovulación (defeminización), receptividad sexual parcial o totalmente impedida y el patrón completo de comportamiento sexual masculino luego de la administración de T en la adultez. Por otro lado, si las ratas macho son castradas perinatalmente se vuelven incapaces de mostrar patrones sexuales masculinos en la adultez, aún frente a la administración de T (demasculinización). En su lugar muestran comportamiento de lordosis (característico de hembra sexualmente receptiva) ante la administración de E_2 y P_4 , y patrones femeninos de secreción hormonal frente al tratamiento con E_2 . Si las ratas machos son deprivadas de andrógenos prenatales por tratamiento con antiandrógenos

durante la gestación, no ocurre el normal desarrollo de los caracteres sexuales masculinos, tanto anatómicos como comportamentales (Feder et al., 1966; Domer, 1981; Arnold, 1984; Dohler, 1991; Becu-Villalobos et al., 1997).

Por último, en general se acepta que la organización sexual del tejido nervioso central es inherentemente femenina y que la diferenciación a hembra procede en ausencia de influencias hormonales específicas a menos que la diferenciación masculina sea impuesta por andrógenos o estrógenos durante un período crítico del desarrollo. Sin embargo, varios estudios mostraron que la diferenciación sexual del cerebro a hembra, o aún el desarrollo del cerebro *per se*, requiere estimulación estrogénica activa durante un período sensitivo del desarrollo para la total expresión de las características femeninas. (Becu-Villalobos et al., 1997).

En 1959 Phoenix y col. postularon que los esteroides gonadales actuaban sobre el cerebro de dos maneras, tempranamente, con efectos permanentes asociados a acciones genómicas, organizando caminos neurales que conducen a diferencias sexuales en el cerebro y el comportamiento, y más tarde en la adultez, actuando sobre los caminos sexualmente dimórficos para activar/regular comportamientos o funciones previamente organizadas (Phoenix et al., 1959). Hoy también se acepta que existen diferenciaciones sexuales transientes en el cerebro en desarrollo que pueden originar tanto diferencias permanentes de estructuras cerebrales como también prevenirlas, al compensar los posibles efectos diferenciadores de los niveles de hormonas gonadales sexualmente dimórficos y de la expresión de genes ubicados en los cromosomas sexuales (De Vries, 2004).

Hormonas sexuales y neurotransmisores

Gran cantidad de evidencias indica que, durante el desarrollo, los esteroides gonadales actúan sobre el cerebro y promueven el crecimiento de neuronas responsivas e influyen el metabolismo de neurotransmisores y la conductividad neuronal alterando así los patrones de supervivencia neuronal y la conectividad sináptica.

Estos efectos organizacionales tempranos de los esteroides podrían conducir a cambios esencialmente permanentes en la transmisión sináptica y actividad neuronal en general, los que resultarían en una diferenciación sexual del cerebro. Tales diferencias pueden ser estructurales (variaciones en los números, densidades y/o conectividades de las neuronas) o funcionales (variaciones en los niveles de expresión de neurotransmisores específicos, enzimas o receptores) en regiones del cerebro sexualmente dimórficas.

Las interacciones entre esteroides y neurotransmisores han sido ampliamente investigadas en animales adultos. Estas hormonas regulan la actividad de neuronas que expresan receptores para las mismas. Más aún, se sabe que las hormonas sexuales influyen la diferenciación sexual de varios sistemas de neurotransmisores (Dohler, 1991).

Por otro lado, dado que los neurotransmisores juegan un rol importante en el desarrollo del SNC (Lipton and Kater, 1989; Nguyen et al., 2001) y en los eventos sinápticos, incluyendo cambios en la excitabilidad de las membranas neuronales, se ha propuesto que ellos también podrían poseer roles activos en la construcción de las diferencias sexuales estructurales del cerebro (Beyer and Feder, 1987). Se ha estudiado la participación del neurotransmisor GABA en dichos eventos, como veremos a continuación (Segovia et al., 1999).

EL ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO

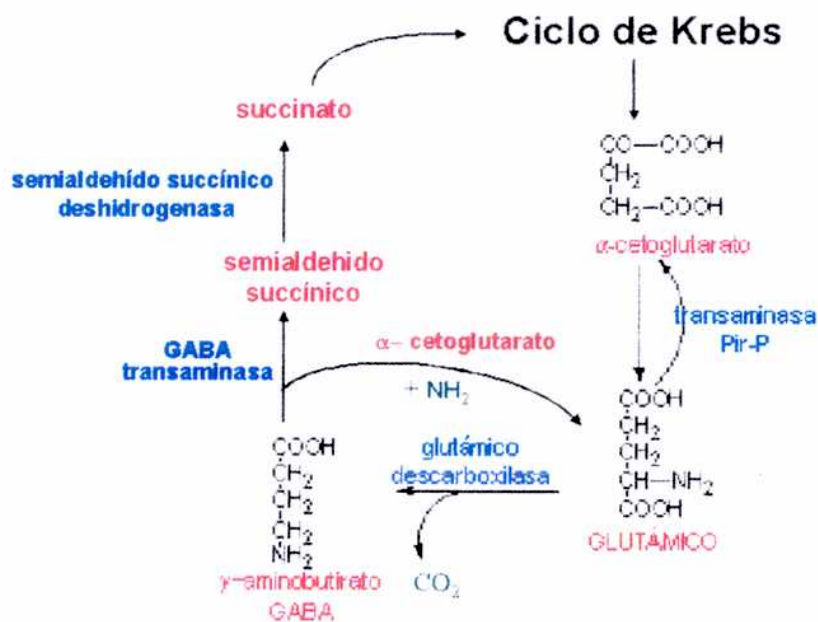
En los mamíferos adultos, el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro. Este aminoácido no proteico es sintetizado en aproximadamente el 20–30 % de las neuronas de todo el SNC. Se postula que el GABA además de neurotransmisor y metabolito, también actúa como una neurotrofina para las neuronas en diferenciación, al modular la proliferación de los progenitores neurales, promover y regular la migración de los precursores neuronales y acelerar la maduración neuronal; jugando así un rol morfogenético durante el desarrollo embrionario (Varju et al., 2001).

Metabolismo del ácido γ amino butírico (GABA)

El GABA es principalmente producido a partir de glucosa, aunque el piruvato y otros aminoácidos pueden servir como precursores; en efecto su metabolismo está íntimamente relacionado con los ciclos del glutamato y glutamina (Waagepetersen et al., 1999).

La síntesis de GABA en el cerebro parece tener lugar en el cuerpo celular y en la terminal nerviosa. El GABA se origina vía decarboxilación del L-glutamato por la enzima ácido glutámico decarboxilasa (GAD). Se han encontrado en las neuronas GABAérgicas de los vertebrados dos formas de GAD (GAD₆₅ y GAD₆₇), codificadas por genes distintos, las que difieren en sus propiedades cinéticas, distribución intracelular y en sus interacciones con el cofactor piridoxal-fosfato. Esto, junto a la existencia de dos *pools* de GABA distintos ha promovido la idea que cada isoforma podría estar especializada para sintetizar un *pool* específico de GABA. Estos *pools* servirían para distintas funciones (Martin et al., 2000).

El GABA también se origina del llamado *shunt* tricarboxílico del GABA, en el cual un intermediario del ciclo de Krebs, α -cetoglutarato, es transaminado a L-glutamato, sustrato de la GAD para producir GABA. Este a su vez es transaminado por la GABA aminotransferasa mitocondrial (GABA-T) a semialdehído succínico (SSA), el cual es rápidamente oxidado a succinato por la SSA deshidrogenasa (SSADH) y vuelve a entrar al ciclo de Krebs. En la transaminación de GABA a SSA, el α -cetoglutarato se vuelve aceptor del grupo amino produciendo glutamato, así cerrando el *shunt* de GABA y manteniendo el suministro de este precursor del GABA. Las neuronas son incapaces de hacer síntesis *de novo* de GABA a partir de glucosa siendo así dependientes de los astrocitos para la síntesis neta de GABA, pues carecen de la enzima: piruvato decarboxilasa necesaria para la síntesis *de novo* de componentes del ciclo de Krebs, presente sólo en astrocitos (Shank et al., 1985; De Robertis, 1986).



Esquema del metabolismo del GABA

Otra fuente de GABA es la síntesis a partir de poliaminas, siendo la enzima clave de esta ruta la enzima ornitina decarboxilasa (Seiler, 1980).

Receptores gabaérgicos

La respuesta a GABA es mediada a través de tres tipos de receptores, el receptor GABA_A (RGABA_A), el GABA_B (RGABA_B) y, el más recientemente descrito GABA_C (RGABA_C). Estos se han clasificado sobre la base de sus distintas propiedades farmacológicas, fisiológicas y moleculares (Chebib and Johnston, 1999).

La neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA exhibe un componente rápido y uno lento en el SNC adulto. Los RGABA_A y RGABA_C son los responsables de una inhibición sináptica rápida (Macdonald and Olsen, 1994; Bormann and Feigenspan, 1995) mientras que los RGABA_B serían los responsables de las señales inhibitorias lentas y de larga duración (Bowery, 1989).

Características de los Receptores GABA_A y GABA_C

Características moleculares: Los RGABA_A y RGABA_C son de tipo ionotrópicos y pertenecen a la superfamilia de canales iónicos cuya apertura es estimulada por la unión de su ligando. Se cree que estos dos tipos de receptores son estructuralmente muy similares pues ambos están compuestos por cinco subunidades, con 4 dominios transmembrana cada una, que conforman un canal de cloruro (Cl⁻). Las regiones C- y N-terminales son extracelulares y parte del sitio de unión a agonistas / antagonistas yace dentro de la región N-terminal (Chebib and Johnston, 1999). Sin embargo, la composición de estos receptores es distinta. Los RGABA_A son hetero-oligómeros compuestos por una mezcla de las subunidades α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-4} , δ y ϵ (Rudolph et al., 2001). En cambio los RGABA_C representan una forma relativamente simple de los

RGABA_A, son homo- o hetero-oligómeros formados por combinación de isoformas de una única subunidad ρ (Chebib and Johnston, 1999).

Características fisiológicas: La activación de los sitios GABA_A permite la difusión del ión Cl⁻ a favor de su gradiente de concentración, resultando típicamente en las neuronas maduras, en un aumento de la concentración intracelular de Cl⁻ y una hiperpolarización de la célula (Smith and Olsen, 1995).

Por otro lado, en neuronas inmaduras la concentración de Cl⁻ es mayor en el medio intracelular, pues los niveles de los cotransportadores de membrana que expulsan el Cl⁻ aún no han aumentado. Por lo tanto, ante un estímulo de GABA o agonistas del RGABA_A se origina un eflujo de Cl⁻ y la despolarización de la membrana, provocando, ocasionalmente, un potencial de acción, y generalmente la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, predominantemente los de tipo L, con el consecuente aumento del Ca²⁺ intracelular. Este aumento de Ca²⁺ lleva a la fosforilación de la proteína ligadora del elemento respondedor a AMPc (CREB) a través de distintos tipos de quinasas. Este CREB fosforilado es transcripcionalmente activo y puede llevar a la modificación de eventos como la supervivencia neuronal o la plasticidad neuronal. Esta sería la forma en que el GABA ejerce sus efectos morfogénicos en etapas tempranas del desarrollo (McCarthy et al., 2002).

Con respecto a los RGABA_C, estudios electrofisiológicos mostraron que conducen menos corriente que los RGABA_A. Al ser activados los RGABA_C, el canal de Cl⁻ tiene mayor tiempo de apertura que los RGABA_A y se desensibilizan más lentamente con la aplicación sostenida de agonistas (Bormann and Feigenspan, 1995; Johnston, 1996b)

Características farmacológicas: Los RGABA_A son bloqueados selectivamente por el alcaloide bicuculina y son modulados por benzodiazepinas, esteroides y barbitúricos

(Johnston, 1996a). En cambio los RGABA_C no responden a ninguno de estos compuestos, pero son activados por el ác. cis-aminocrotónico (CACA), bloqueados selectivamente por el ác. (1, 2, 5, 6-tetrahidropiridin -4-il) metilfosfónico (TPMPA) y poco se conocen sus moduladores (Bormann and Feigenspan, 1995; Johnston, 1996b).

Características de los Receptores GABA_B

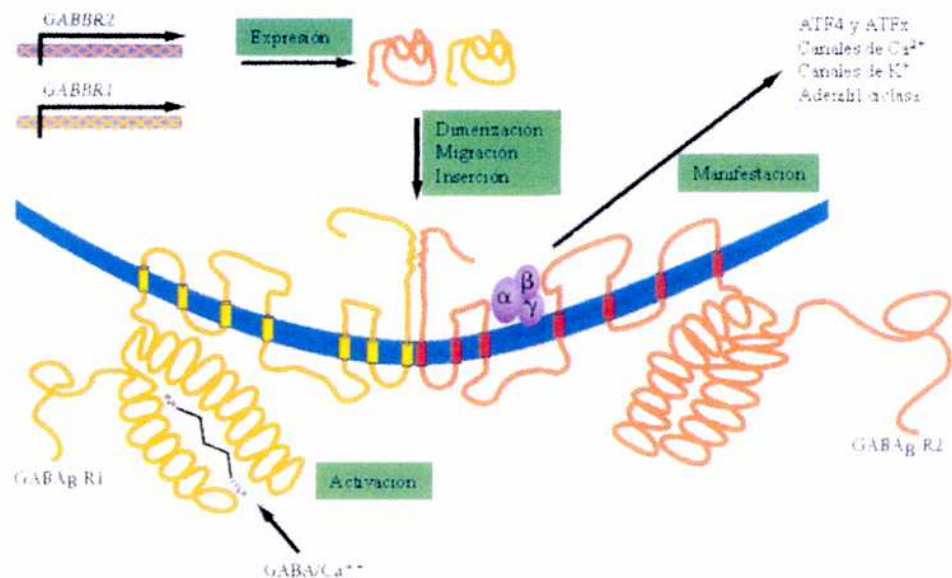
Los RGABA_B son del tipo metabotrópico e inhiben en el sistema nervioso la transmisión sináptica a través de proteínas que unen nucleótidos de guanina (Proteínas G) acopladas a sistemas efectores generadores de segundos mensajeros intracelulares y a canales iónicos. La estimulación de los RGABA_B ubicados en cuerpos neuronales y dendritas promueve potenciales postsinápticos inhibitorios lentos de larga duración (IPSPs) mientras que la activación de los ubicados en terminales nerviosas presinápticas inhibe la liberación de neurotransmisores. Si estas terminales presinápticas son GABAérgicas se los considera autoreceptores, si las terminales corresponden a otros neurotransmisores se los considera heteroreceptores.

Los RGABA_B fueron clasificados y caracterizados farmacológicamente primero por Hill y Bowery en 1981 (Hill and Bowery, 1981). Aunque se expresan abundantemente en el SNC de mamíferos, su estructura permaneció evasiva hasta que en 1997 Kaupmann y col. aislaron dos variantes de *splicing* del receptor llamadas RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)} (Kaupmann et al., 1997). Estas glicoproteínas difieren solamente en sus extremos carboxi terminal, donde los primeros 147 aminoácidos del RGABA_{B(1a)} (Mr = 130 KDa) son reemplazados por una secuencia diferente de 18 aminoácidos en RGABA_{B(1b)} (Mr = 100 KDa). Luego se determinó la existencia de una segunda subunidad del receptor, la RGABA_{B2} (Mr = 110 KDa) con un 54% de similitud en la

secuencia aminoacídica y un 35% de homología de secuencia con la subunidad RGABA_{B1} (Kaupmann et al., 1998).

El clonado de los RGABA_B reveló que ambas subunidades, originadas de dos genes diferentes, presentan una estructura molecular característica de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), con un gran extremo N-terminal extracelular seguido de siete dominios transmembrana (7 DTM) y una cola C-terminal intracelular (Blein et al., 2000; Bowery et al., 2002; Bettler et al., 2004). Estos receptores pertenecen a la misma familia que el receptor metabotrópico de glutamato, los receptores sensores de calcio, los receptores vomeronasales, los receptores de feromonas y los receptores putativos del gusto.

Para que el receptor sea completamente funcional, apropiadamente sensible a sus agonistas y se exprese en membrana, debe formarse una asociación heterodimérica estable entre una subunidad RGABA_{B1} y una RGABA_{B2} (Kaupmann et al., 1997; Kaupmann et al., 1998; White et al., 1998; Jones et al., 1998; Kuner et al., 1999). Dicho requisito está demostrado por estudios con ratones con silenciamiento del gen de la subunidad RGABA_{B1}, los cuales carecen de actividad de RGABA_B (Schuler et al., 2001; Prosser et al., 2001). Si bien el sitio de unión para ligandos, agonistas y antagonistas está en el dominio extracelular N-terminal de la subunidad RGABA_{B1}, en la activación del receptor dependiente de agonista (cuya unión requiere del ión Ca²⁺) también participa el dominio N-terminal de RGABA_{B2} (Okamoto et al., 1998; Galvez et al., 2000). Por otro lado, la subunidad RGABA_{B2} es crucial para el acople con los efectores intracelulares y necesaria para el correcto tráfico de RGABA_{B1} a la membrana plasmática (Duthey et al., 2002).



Representación esquemática del ensamblado y función del RGABA_B.
Tomado de S.J. Enna, 2001 (Enna, 2001).

El ensamblaje entre ambas subunidades probablemente ocurra a nivel del retículo endoplasmático (RE) por una interacción entre dos dominios cortos, conservados, ubicados centralmente en el extremo C-terminal intracelular de las mismas, llamados dominios *coiled-coil* que formarían una α hélice. Así se enmascara una secuencia de retención en RE, presente en la cola C-terminal de RGABA_{B1} asegurando que sólo receptores correctamente ensamblados alcancen la superficie celular (Pagano et al., 2001). No se han observado interacciones entre dos subunidades RGABA_{B1} ni entre dos subunidades RGABA_{B2}.

Si bien se sabía que los GPCR eran capaces de formar homodímeros, con el descubrimiento de los RGABA_B se demostró directamente que la heterodimerización de receptores con 7DTM puede ser esencial para su función. Recientemente se ha visto heterodimerización entre los receptores opiodes δ y κ y entre diferentes familias de GPCR, por ejemplo: el receptor de somatostatina con el de dopamina D₂. De todas

formas, el RGABA_B es el único ejemplo conocido donde dos GPCR aparentemente no funcionales se dimerizan, tornando al receptor resultante en funcional (Jordan and Devi, 1999).

Las evidencias de una regulación diferencial de los genes que codifican para ambas subunidades, las diferencias en la distribución de estas proteínas entre varias regiones del cerebro y tejidos periféricos (McCarson and Enna, 1999; Benke et al., 1999; Durkin et al., 1999; Clark et al., 2000) y estudios de inmunoprecipitación, sustentan la posibilidad de una asociación de cualquiera de las subunidades del RGABA_B con otras proteínas no relacionadas estructuralmente. Más aún, ratones deficientes para RGABA_{B2} expresan RGABA_{B1} en sus membranas neuronales de hipocampo, aunque en soma y dendritas proximales en vez de sitios neuronales distantes, exhibiendo respuestas RGABA_B atípicas (Gassmann et al., 2004). Es importante señalar que se han descrito asociaciones entre estas subunidades con los factores de transcripción CREB2 (ATF4) y ATFx (Nehring et al., 2000; White et al., 2000; Couve et al., 2001). Además se conocen otras proteínas que actúan como accesorias para el correcto procesamiento, translocación a la superficie celular y actividad de receptores con 7DTM, como ser proteínas modificadoras de la actividad del receptor (RAMP1 y RAMP2) (McLatchie et al., 1998). Finalmente, dado que se han observado asociaciones entre diferentes familias de GPCR, es probable que las subunidades del RGABA_B puedan interactuar con otros GPCR.

Subtipos de RGABA_B: Si bien hay controversias sobre la existencia de formas molecular y farmacológicamente diferentes del RGABA_B, sería bastante sorprendente que fuera el único ejemplo de un receptor metabotrópico sin subtipos. Los RGABA_B parecen ser estructuralmente heterogéneos, en el sentido que existen varias variantes de

splicing de las dos subunidades conocidas, pero las evidencias de subtipos de receptor funcionalmente distintos son limitadas (Bowery et al., 2002).

La distinción entre unión de alta y baja afinidad al RGABA_B en el cerebro de rata fue tomada como una indicación de sitios farmacológicamente distintos pero características de unión heterogéneas pueden simplemente reflejar estados conformacionales diferentes de un único receptor. Una variedad de métodos se ha usado en la búsqueda de RGABA_B farmacológicamente distintos: ensayos de afinidades de antagonistas específicos relativas a sus habilidades para bloquear respuestas mediadas por estos receptores, estudios de efectos de agonistas y antagonistas sobre las respuestas de segundos mensajeros y estudios de respuestas electrofisiológicas a estos compuestos. Estos arrojaron evidencias indirectas que sugerirían la presencia de subtipos de receptor: respuesta electrofisiológica diferencial entre los RGABA_B pre y postsinápticos frente a ciertos agonistas y antagonistas, posible acople diferencial de los subtipos a distintas clases de proteínas G. Sin embargo, no se dispone actualmente de ligandos que realmente distingan entre potenciales subtipos (Enna, 2001).

La existencia de variantes de *splicing* alternativo de ambas subunidades podría determinar la presencia de distintos subtipos de receptores. Las primeras variantes identificadas: $\text{RGABA}_{B(1a)}$ y $\text{RGABA}_{B(1b)}$ sólo difieren en áreas que no estarían asociadas con la unión al ligando. Estas variantes se distribuyen diferencialmente en el SNC y periférico. No se podría asignar de manera general un rol funcional o una localización celular a las mismas. Si bien $\text{RGABA}_{B(1b)}$ es predominantemente postsináptica y $\text{RGABA}_{B(1a)}$ es predominantemente presináptica en el cerebelo (Billinton et al., 1999; Princivalle et al., 2000), lo contrario se observa en el cerebro (Benke et al., 1999; Princivalle et al., 2001). Posteriormente se identificaron cinco

isoformas adicionales de variantes de splicing de RGABA_{B1} : $\text{RGABA}_{\text{B(1c-g)}}$ (Isomoto et al., 1998; Pfaff et al., 1999; Schwarz et al., 2000; Wei et al., 2001) y tres de la subunidad RGABA_{B2} . No todas estas isoformas del RGABA_{B1} son capaces de formar RGABA_{B} funcionales cuando se unen a RGABA_{B2} , regulando así el número de receptores activos (Schwarz et al., 2000). Estas variantes adicionales se encontraron en varios tejidos del SNC y tejidos periféricos, expresándose $\text{RGABA}_{\text{B(1c)}}$ en ambos lugares mientras que las subunidades $\text{RGABA}_{\text{B(1d)}}$ y $\text{RGABA}_{\text{B(1e)}}$ lo hacen principalmente en tejidos periféricos.

Los estudios con ratones *knockout* para RGABA_{B2} sugieren que esta subunidad es esencial para la localización del receptor en procesos distales pero no para la señalización (Gassmann et al., 2004), mientras que los estudios con ratones *knockout* para RGABA_{B1} indican que esta subunidad es absolutamente esencial para un RGABA_{B} funcional (Schuler et al., 2001). Por lo tanto, si bien aún no se han identificado subtipos del RGABA_{B} , sobre la base de estos resultados se puede postular que los mismos podrían estar compuestos por una subunidad RGABA_{B1} y en lugar de la subunidad RGABA_{B2} una proteína capaz de sustituirla como chaperona y en el acople a los sistemas efectores.

Características fisiológicas: Como ya mencionamos, los RGABA_{B} inhiben la actividad neuronal en el SNC a través de proteínas G acopladas a sistemas generadores de segundos mensajeros intracelulares y a canales iónicos. Estos receptores interactúan principalmente con proteínas G de las clases G_i/G_o sensibles a la toxina de Pertussis. Sin embargo, se han observado efectos que estarían mediados por proteínas G_q (Kaupmann et al., 1997; Blein et al., 2000).

Los mecanismos efectores asociados con los RGABA_B neurales son el sistema adenilil ciclasa y los canales iónicos de Ca²⁺ y K⁺ (Bowery et al., 2002). La subunidad $\alpha_{i/o}$ de la proteína G estimulada inhibe la actividad de la adenilil ciclasa tanto basal como estimulada (Hill, 1985; Xu and Wojcik, 1986) mientras que, las subunidades $\beta\gamma$ alteran la conductancia del Ca²⁺ o del K⁺ a través de la membrana (Bindokas and Ishida, 1991; Gage, 1992), según la localización pre- o postsináptica del receptor. Los auto y heteroreceptores GABA_B presinápticos inhiben la liberación de neurotransmisores principalmente a través de la inactivación de canales de Ca²⁺ voltaje dependientes del tipo N, L, P/Q disminuyendo así la conductancia de este ión (Takahashi et al., 1998). Los sitios GABA_B postsinápticos, responsables de los IPSPs, principalmente activan múltiples tipos de canales de K⁺, como los tipo Kir3 (también conocidos como GIRK: *G-protein-regulated-inwardly rectifying K⁺ channels*), aumentando la conductancia de este ión, y provocando la hiperpolarización de las neuronas (Slesinger et al., 1997; Luscher et al., 1997).

También se ha descrito que estos receptores pueden estimular la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Duman et al., 1986), modular la hidrólisis de inositoles fosfolipídicos (Crawford and Young, 1988) y las actividades de la proteína quinasa C (PKC), de la proteína quinasa A (PKA) y de la proteína quinasa regulada por mitógenos (MAPK) (Vanhoose et al., 2002; Kubota et al., 2003).

Características farmacológicas y efectos clínicos: El agonista esteroespecíficamente activo del RGABA_B: Baclofen (β -[4-clorofenil] GABA) aportó parte de la evidencia original de un receptor distinto. Posteriormente surgieron otros agonistas 3 a 7 veces más potentes, como ser el: 3-APPA (ác. 3-aminopropil-fosfónico) y su homólogo metilado 3-APMPA. Estos compuestos se usan en el tratamiento de la espasticidad y

rigidez de músculo esquelético, en el dolor neuropático y en el dolor asociado al daño o ruptura de la médula espinal. Además reducen la avidez por un número de sustancias adictivas (como ser opio, heroína, alcohol, cocaína y nicotina), presentan actividad antitusiva, anti-isquémica en el corazón e inhiben la motilidad intestinal y la broncoconstricción mediada por el nervio vago (Bowery et al., 2002).

Los primeros antagonistas selectivos del receptor descritos: faclofen, saclofen y 2-hidroxisaclofen presentan afinidades en el rango micromolar. Posteriormente se desarrollaron otros antagonistas con mayor afinidad por el receptor como el CGP55845. Estos agentes mejoran el rendimiento cognitivo y pueden tener actividades antidepresivas y antipsicóticas además de propiedades neuroprotectoras (Bowery et al., 2002).

Regulación GABAérgica de la función hipofisaria.

El GABA además de estar implicado en la regulación de varios procesos fisiológicos incluyendo: dolor, aprendizaje y memoria e integración sensitivo-motora, está involucrado en el control neuroendócrino de la secreción de varias hormonas hipofisarias actuando como un factor modulador a nivel del SNC y directamente sobre la hipófisis, donde se expresan sus tres tipos de receptores. Varias evidencias anatómicas como fisiológicas sustentan esta función del GABA.

La función hipofisaria es afectada por tres sistemas GABAérgicos. Uno de ellos es el sistema GABAérgico túberoinfundibular (TIGABA), cuyas neuronas se encuentran en el NA y descargan directamente en la EM (Racagni et al., 1984). Este GABA alcanza la hipófisis anterior por los vasos portales largos. El sistema GABAérgico túberohipofisario (THGABA) se origina en la región anterior del NA y en el área

periventricular proyectando sus terminales nerviosas hacia el lóbulo neurointermedio (Tappaz et al., 1986), donde el GABA actúa directamente sobre los melanotropos inhibiendo la secreción de α -MSH y posiblemente inhiba la secreción de oxitocina (Crowley and Armstrong, 1992) y vasopresina (Sladek and Armstrong, 1987) en el lóbulo neural. Finalmente el tercer sistema GABAérgico es extrínseco, con los somas neuronales situados en regiones extrahipotalámicas y las terminales proyectándose hacia el HTMB donde establecen sinapsis con neuronas implicadas en el control de la función hipofisaria (por ejemplo: neuronas GnRH, TRH, DA, serotonina y somatostatina) (Tappaz, 1984).

Dado que la adenohipófisis carece de innervación GABAérgica, generalmente se consideraba que la fuente del GABA presente en la misma, era el hipotálamo y que éste accedía a la glándula por la circulación portal. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la existencia de síntesis (expresión de GAD) y almacenamiento local de GABA situada principalmente en las células POMC del lóbulo intermedio y en los somatotropos del lóbulo anterior (Mayerhofer et al., 2001).

La existencia de sitios de unión GABA_A fue demostrada en la pituitaria (Grandison, 1981; Fiszer de Plazas et al., 1982). La presencia de sitios de unión GABA_B hipofisarios, regulando la secreción hormonal, fue establecida por nuestros estudios funcionales *in vitro* (Lux-Lantos et al., 1992; Rey-Roldán et al., 1996) y demostrada en ratas macho adultas mediante estudios de unión por Anderson y col. (Anderson and Mitchell, 1986b). Recientemente se demostró la presencia de RGABA_B en somatotropos y de RGABA_C en tirotropos y somatotropos de rata por técnicas moleculares. (Boue-Grabot et al., 2000; Gamel-Didelon et al., 2002; Gamel-Didelon et al., 2003).

GABA y secreción de las hormonas de la hipófisis anterior

Los efectos del GABA sobre la producción hormonal adenohipofisaria dependen de varios factores, como ser la concentración, el estado de desarrollo del animal y las condiciones experimentales.

GABA y secreción de gonadotrofinas

Se ha observado un efecto dual del GABA sobre la secreción de gonadotrofinas 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 (Lamberts et al., 1983; Fuchs et al., 1984). Este efecto se debería a una acción a nivel central, en el cual estarían involucrados los $RGABA_A$ y $RGABA_B$. Se ha postulado que las neuronas GABAérgicas modulan indirectamente la secreción de GnRH, y por ende de LH, al regular neuronas estimuladoras (Donoso et al., 1994) y/o inhibitorias de la actividad de las neuronas GnRH a través de los $RGABA_A$ y $RGABA_B$. Se demostró que GABA inhibe a las neuronas noradrenérgicas ubicadas en el hipotálamo, implicadas en la regulación positiva de la secreción de GnRH (Fuchs et al., 1984; Adler and Crowley, 1986). Pero, dada la existencia de una innervación directa de las neuronas GABAérgica sobre las neuronas GnRH, no se puede descartar una inhibición directa del GABA sobre la liberación de este decapeptido (Leranth et al., 1985). Cabe señalar que en neuronas decapeptidérgicas inmaduras, GT1, el GABA muestra un efecto bifásico sobre la liberación de GnRH con una estimulación inicial transitoria (mimetizada por muscimol), seguida de una inhibición sostenida de la secreción, probablemente vía los $RGABA_B$ (Kordon et al., 1994). Varios trabajos muestran que el GABA tiene efectos despolarizantes en células inmaduras.

Además, en cuanto al rol excitatorio del GABA y de agonistas GABA_A sobre la liberación de GnRH, éste se ha observado tanto en estudios *in vitro*, con fragmentos de EM y cortes de hipotálamo, (Nikolarakis et al., 1988; Masotto et al., 1989; Carbone et al., 2002) como *in vivo*, en los cuales se administró GABA en la vecindad de la EM (Vijayan and McCann, 1978). Se postula que se trataría de una inhibición GABAérgica de neuronas CRH y por ende inhibición de la liberación de péptidos opiodes, inhibitorios a su vez sobre la secreción de GnRH (Nikolarakis et al., 1988). También se ha reportado 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 (Moguilevsky and Wuttke, 2001).

Estos datos en su conjunto indican que el GABA *in vivo* puede ejercer ambas acciones, estimuladoras e inhibitorias, donde cada una de ellas puede predominar según el estado fisiológico, endócrino o madurativo del animal (Nikolarakis et al., 1988; Cho and Kim, 1997).

Al analizar las acciones directas del GABA sobre la secreción hipofisaria, se demostró un efecto estimulatorio sobre la liberación de LH y FSH en la hipófisis anterior a través de los RGABA_A (Anderson and Mitchell, 1986c; Virmani et al., 1990; Brann et al., 1992). A su vez trabajos de nuestro laboratorio demostraron que el GABA, a través de los RGABA_B, 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 (Lux-Lantos et al., 1992; Rey-Roldán et al., 1996).

GABA y secreción de Prolactina

El GABA también desempeña un rol dual en el control neuroendócrino de la secreción de prolactina. Se ha reportado que un incremento en sus niveles, ya sea por administración intra cerebro ventricular o por inhibición de su degradación enzimática, conduce a una aumento de la prolactinemia (Libertun and McCann, 1976; Locatelli et al., 1979), probablemente como resultado de un efecto inhibitorio sobre las neuronas TIDA hipotalámicas (Fuchs et al., 1984; Tuomisto and Mannisto, 1985). Por otro lado el efecto del GABA directamente sobre la hipófisis inhibe la secreción de PRL (Libertun et al., 1979). Más aún, dado que la PRL aumenta la actividad GAD hipotalámica, el *turnover* y la liberación de GABA (Casanueva et al., 1984) se ha sugerido la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativo rápido entre los lactotopos y las neuronas TIGABA (Duvilanski et al., 1986; Apud et al., 1989). Es más, nosotros encontramos que en animales enteros, la activación de los RGABA_B produce un efecto dual (estimulador o inhibitorio) sobre la liberación, tanto basal como estimulada de PRL dependiendo de la edad de la rata (Rey-Roldán et al., 1997). Un efecto dual también fue descrito por otros autores (Kimura et al., 1993). También demostramos, en estudios *in vivo*, que el Baclofen es capaz de bloquear la secreción de PRL estimulada por distintos tipos de estrés sin alterar la liberación basal en ratas macho adultas y la secreción de PRL estimulada por succión en ratas lactantes (D'Eramo et al., 1986; Lux et al., 1986).

Por lo tanto, el efecto de este neurotransmisor sobre la regulación de la PRL, a nivel central, dependería de la situación funcional o experimental estudiada.

Con respecto a la acción directa del GABA sobre el lactotrofo, se ha observado que al igual que para GnRH, el GABA presenta un efecto bifásico sobre la secreción de

PRL, siendo tanto la estimulación inicial transitoria como la consiguiente inhibición sostenida mimetizadas por muscimol (Anderson and Mitchell, 1986a). Otros autores observaron sólo efectos inhibitorios sobre la síntesis y secreción de prolactina a través de los RGABA_A y RGABA_B (Loeffler et al., 1986; Anderson and Mitchell, 1986a; Lux-Lantos et al., 1992)). De esta forma, se lo podría considerar un PIF, aunque requiere de concentraciones mayores que la DA para ejercer este efecto.

GABA y secreción de otras hormonas hipofisarias

En general se observó que un aumento en el tono gabaérgico induce un efecto inhibitorio sobre la secreción de GH, la secreción basal y estimulada de TSH y la secreción basal o estimulada de CRH hipotálamico en la rata (Tuomisto and Mannisto, 1985). GABA ejercería estos efectos tanto a través de los RGABA_A como RGABA_B. Los resultados de trabajos que estudian los efectos directos del GABA sobre la secreción de GH, TSH y ACTH a nivel hipofisario son muy variables dependiendo del método, los modelos, las condiciones y las dosis utilizadas *in vitro* (Roussel and Astier, 1990; Anderson and Mitchell, 1986c; Rey-Roldán et al., 1996). Recientemente se demostró que la estimulación de los RGABA_B hipofisarios lleva a un aumento en la secreción de GH (Gamel-Didelon et al., 2002); por otro lado, la activación de los RGABA_C lleva a una despolarización en tirotropos y somatotropos, pero no se describió si este efecto está acoplado a la secreción hormonal (Boue-Grabot et al., 2000; Gamel-Didelon et al., 2003).

OBJETIVOS GENERALES

El GABA, como ya mencionamos, está involucrado en el control neuroendócrino de la secreción anterohipofisaria actuando a nivel del SNC y directamente sobre la glándula. En el laboratorio se ha estudiado la participación de los RGABA_B en dicha regulación tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Sobre la base de estas evidencias, nos propusimos determinar la expresión y los mecanismos de acción de los RGABA_B en la unidad hipotálamo-hipofisaria. Concretamente los objetivos planteados fueron los siguientes:

1. Estudiar la expresión de las subunidades RGABA_{B1} y RGABA_{B2} del receptor, en la hipófisis anterior y el hipotálamo de ratas hembras y machos durante el desarrollo postnatal.
2. Evaluar el rol que desempeñan los esteroides sexuales sobre la expresión de los RGABA_B en la hipófisis anterior.
3. Evaluar el rol que desempeñan los esteroides sexuales sobre los niveles del GABA y otros aminoácidos en el hipotálamo.
4. Determinar la participación directa del GABA y de hormonas gonadales en la regulación de la expresión de los RGABA_B en cultivos de células adenohipofisarias.
5. Caracterizar el sistema de segundo mensajeros y los canales iónicos involucrados en el camino de transducción de señales que se desencadena luego de la activación de los RGABA_B adenohipofisarios.

CAPÍTULO I:

**Expresión ontogénica de las subunidades del
receptor GABA_B en la hipófisis anterior y el
hipotálamo**

Introducción

Tanto el GABA como sus enzimas biosintéticas y sus receptores RGABA_A y RGABA_B presentan distribuciones ontogénicas particulares en diferentes áreas del SNC, incluyendo regiones críticamente involucradas en el control de la secreción de hormonas adenohipofisarias (Duvilanski et al., 1984; Lacau-Mengido et al., 1989; Shinohara et al., 1989; MacLennan et al., 1991; Ma et al., 1993; Turgeon and Albin, 1994; Jussofie, 1995; Das and Ray, 1996; Arvat et al., 2002; Simeone et al., 2003). Más aún, se piensa que el GABA juega un papel importante como agente neurodiferenciante a lo largo del desarrollo (Waagepetersen et al., 1999). En el cerebro de la rata, se reportó un cambio en la composición de las subunidades del RGABA_A durante la ontogenia (Fritschy et al., 1994). Se han descrito, también, distintos patrones de respuestas de las hormonas adenohipofisarias al GABA, a través de la estimulación de los RGABA_A y RGABA_B, en ratas hembras y machos en desarrollo (Moguilevsky et al., 1992; Rey-Roldán et al., 1997).

Con respecto a la distribución ontogénica, algunos autores sugieren que los RGABA_B estarían presentes en el cerebro de roedores desde estadios tempranos de la vida y aumentan a tiempos regionalmente específicos durante las tres primeras semanas de vida y luego declinan a niveles de adultos (Turgeon and Albin, 1994; Bowery, 1996). Otros grupos han reportado que la expresión proteica del receptor disminuye o no varía a lo largo de la ontogenia, dependiendo de la región del sistema nervioso analizada (Malitschek et al., 1998); en algunos casos también se ha observado un cambio en la expresión de las distintas variantes de *splicing* de las subunidades del receptor (Malitschek et al., 1998; Fritschy et al., 1999b). Sin embargo, la expresión hipofisaria e

hipotalámica de los RGABA_B durante el desarrollo en hembras y machos era aun desconocida.

En vista de la importancia del GABA sobre la función de la pituitaria y los nuevos hallazgos sobre la composición molecular de los RGABA_B, el objetivo de este capítulo fue determinar la ontogenia de la expresión de las subunidades del RGABA_B anterohipofisarias e hipotalámicas en ratas de ambos sexos.

Materiales y Métodos

Animales

Para éste y los próximos capítulos los animales utilizados fueron ratas de la cepa Sprague-Dawley de la colonia del Instituto de Biología y Medicina Experimental, alojadas en cuartos con aire acondicionado y luces encendidas de 7.00 a.m. a 7.00 p.m. Los animales tuvieron acceso a alimento balanceado y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a protocolos para el uso de animales, aprobados por el Comité institucional de uso y cuidado de animales (IBYME-CONICET) y por el National Institute of Health (NIH).

Ratas hembras y machos vírgenes (200-250 g) fueron colocadas en grupos para promover el apareamiento. Las madres con sus crías se alojaron en cajas individuales sin ser perturbadas hasta el día del experimento. El día de nacimiento fue considerado como día 1. Las edades estudiadas fueron 1, 4, 12, 20, 28, 38 días y adultas (las ratas hembras adultas fueron usadas en proestro o a los 15 días de lactación). Los animales fueron decapitados, alrededor de las 9.00 a.m. para evitar variaciones circadianas.

Obtención de membranas celulares

Se recolectaron las adenohipófisis y los hipotálamos. Para éste y el próximo capítulo los límites para la disección de los hipotálamos fueron: anterior: quiasma óptico, laterales: las fisuras hipotalámicas, posterior: cuerpos mamilares y en profundidad: el *sulcus* hipotalámico, e incluyendo el área preóptica-supraquiasmática (Becu-Villalobos and Libertun, 1986). Se obtuvieron las fracciones de membrana de acuerdo con el método de Olpe y col. con mínimas modificaciones (Olpe et al., 1990). Brevemente: los tejidos procedentes de los distintos grupos de animales fueron homogenizados a 4 °C en

10 volúmenes de buffer sucrosa 0.32 M frío (conteniendo MgCl_2 1 mM y K_2HPO_4 1 mM, pH 7.4) con un homogenizador vidrio - teflón. Las membranas fueron centrifugadas a 750x g durante 10 min. a 4 °C, el pellet fue resuspendido en un volumen igual de *buffer* de homogenización y se repitió la centrifugación. Se juntaron los sobrenadantes de ambas centrifugaciones y se centrifugaron en frío a 18.000x g por 15 min. A continuación, el sobrenadante se descartó y el pellet fue sometido a *shock* osmótico por 30 min en frío y centrifugado a 39.000x g por 20 min a 4 °C. El pellet fue resuspendido en: Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 2.5 mM pH 7 en 10 volúmenes de buffer Tris con glucosa 5.6 mM/gr de tejido original. En todos los casos se tomaron alícuotas para la determinación de proteínas por el método de Lowry y las membranas se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Para los *Western blots* de hipófisis se necesitaron aproximadamente 12-15 hipófisis para cada muestra de membranas de 4 ó 12 días, 5 hipófisis para cada muestra de 20 ó 28 días y 1-2 hipófisis para cada muestra de 38 días ó adultas. Para los Western blots de HT se necesitaron 2 HT para cada muestra de membranas de 4 ó 12 días y 1 HT para cada muestra del resto de los grupos.

Para los estudios de Scatchard se necesitaron 230 hipófisis para cada muestra de membranas de animales de 4 días, 78 hipófisis para cada muestra de 20 días y 16 hipófisis para cada muestra de adultas.

Análisis de Western blots

El análisis de Western blots de las subunidades del RGABA_B fue realizado según Malitschek y col. (Malitschek et al., 1998). Brevemente, las preparaciones de membranas adenohipofisarias e hipotalámicas obtenidas fueron centrifugadas a 12.000

rpm durante 20 min. Las muestras se resuspendieron en una solución *buffer* conteniendo Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 1%, glicerol 5%, azul de bromofenol 0.1% y DTT 25 mM a una concentración de 1.5- 2 µg de proteína/µl. Así las muestras (30-50 µg de proteínas totales) y los marcadores de peso moleculares apropiados [biotinilados (18-220 kDa) y preteñidos (10-250 kDa)] fueron sujetos a una corrida electroforética en geles de poliacrilamida al 8%, con un *buffer* de corrida (Tris base 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y SDS 0.1%) a 100 V hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. Las proteínas fueron transferidas en frío a membranas de nitrocelulosa, por transferencia electroforética húmeda estándar, en un *buffer* fosfato 0.2 M (2 horas a 50 V). La eficacia de la misma se comprobó por tinción con Rojo Ponceau 0.5%. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas en *buffer* NETG (150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.05% Triton X-100; 0.25% gelatina) durante toda la noche, frío y con agitación. Las subunidades del RGABA_B fueron inmunodetectadas por incubación de 40 min. en agitación con los anticuerpos policlonales de conejo Ab 174.1 (1:3000) y Ab C22 (1:3000) dirigidos contra epitopes presentes en la región carboxi terminal de las subunidades RGABA_{B(1a/b)} y RGABA_{B2} respectivamente. Luego de la incubación con cada anticuerpo se realizaron 6 lavados de 8 min. cada uno con *buffer* NETG. A continuación, las membranas fueron incubadas 45 min. con un anticuerpo anti IgG de conejo acoplado peroxidasa. Luego de los tres lavados se reveló con un sistema amplificador quimioluminiscente para *Western blot* (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz CA) utilizando placas radiográficas AGFA.

En todos los experimentos de inmunodetección, se usó un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra α -syntaxina (1:3000, SIGMA, MO) para asegurar carga proteica comparable (Malitschek et al., 1998). Para ello se cortaron las membranas a la altura del marcador de 59 kDa y la parte inferior fue bloqueada con una solución *buffer* (TBS:

Tris-base 10 mM, NaCl 70 mM) con Tween-20 0.1% (T-TBS) pH 8 y leche descremada 5% en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con T-TBS y leche descremada 2% de 5 min. cada uno y se incubó con el primer anticuerpo anti α -syntaxina preparado en T-TBS y leche descremada 2% a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación. A continuación se realizaron 3 lavados y las membranas se incubaron en agitación con el segundo anticuerpo anti ratón (1:2.000, hecho en cabra, Santa Cruz Biotechnology) acoplado a peroxidasa preparado en T-TBS y leche descremada 2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y finalmente las membranas fueron reveladas. El marcador neuronal α -syntaxina fue seleccionado porque se ha mostrado que se expresa abundantemente en tejido hipofisario (Majo et al., 1998) y no hay documentación de cambios en la expresión de α -syntaxina durante el desarrollo en la pituitaria.

La cuantificación de la imagen para las bandas de las subunidades del RGABA_B y de α -syntaxina fueron siempre hechas en la misma placa radiográfica.

Las imágenes de los *immunoblots* fueron barridas con un *scanner* UMAX (Astra 1200S) integrado a una computadora. La cuantificación de las bandas se realizó con el programa *Image-Quant*, barriendo cada banda en tres dimensiones y corrigiendo la densidad específica según la señal de fondo presente en la calle. Los resultados, en unidades arbitrarias (UA), son el promedio $\pm$ ES de los valores corregidos de las densidades de 4-5 muestras independientes y están expresados como la relación de cada subunidad con respecto al control de α syntaxina.

Ensayo de radiorreceptor

Este ensayo fue realizado esencialmente como el descrito por Bowery y col. (Bowery et al., 1985) con mínimas modificaciones. Para los estudios de Scatchard, las membranas adenohipofisarias fueron descongeladas, dejadas a temperatura ambiente por 30 min., centrifugadas a 12.000x g durante 20 min. y lavadas dos veces con el mismo volumen de *buffer* (Tris HCl 50 mM y Cl_2Ca 2.5 mM, pH 7.4) usado para su obtención, incubando 20 min. a 20 °C entre los lavados. Estos lavados se hicieron a fin de eliminar el GABA endógeno presente en el tejido que pudiera interferir con el ensayo. A continuación, las muestras fueron resuspendidas en una concentración final de aproximadamente 60 mg de tejido original en 200 μl de *buffer* (Tris HCl 50 mM y Cl_2Ca 2.5 mM, pH 7.4) y fueron sometidas a dos procesos de congelado-descongelado, a fin de que se expongan todos los sitios de unión. De cada muestra se tomó una alícuota para la posterior determinación de proteínas mediante el método de Lowry. Las preparaciones de membranas de ratas hembras y machos de 4 y 20 días y adultas se incubaron 40 min. a 20 °C con 50 μl de $^3\text{[H]}$ -Baclofen más 50 μl de *buffer* (para determinar la máxima unión) o más 50 μl de L-Baclofen 6mM (para determinar la unión no específica). El ligando radiactivo ($^3\text{[H]}$ -Baclofen, New England Nuclear (NEN)-PerkinElmers, Boston MA, con actividad específica de 38.7 μCi / mmol) se utilizó a una concentración final entre 12.5 y 200 nM (12.5, 25, 50, 100 y 200 nM). Para cada concentración del ligando radiactivo, las determinaciones de máxima unión (unión total) se realizaron por triplicado y las determinaciones de unión no específica por duplicado (unión inespecífica). El ensayo de unión se inició con el agregado de 200 μl de la suspensión de membranas adenohipofisarias y fue detenido por filtración rápida con un cosechador automático de células *Cell Harvester Nunc* sobre filtros de fibra de

vidrio Whatman GF/B, los cuales fueron lavados dos veces con 300 μ l de *buffer* frío. Los filtros se colocaron en viales de plástico y se los dejó secar. Luego se les agregó 650 μ l de solución centellante (Optiphase 'HiSafe' 3, Fischer Chemicals) y se dejaron durante por lo menos 12 horas a temperatura ambiente antes de la lectura. La radioactividad fue contada en un contador β . Para los análisis de saturación la incubación fue realizada con $^3\text{[H]}$ -Baclofen 200 nM usando las mismas preparaciones de membranas y la misma concentración de Baclofen frío.

Análisis estadístico

Las diferencias sexuales y ontogénicas en la expresión de las subunidades del RGABA_B se analizaron por análisis de varianza en dos sentidos, seguido por *test* de Tukey HSD para N desiguales (Statistica).

El análisis de Scatchard de los datos de unión fue realizado por el programa de computadora Ligand para una única clase de sitios de unión. Cambios en el número de receptores ($B_{\text{máx.}}$) y constantes de disociación (K_d) entre grupos fueron analizados usando análisis de varianza en dos sentidos seguido por *test* de Duncan.

Resultados

Expresión de las subunidades del receptor GABA_B durante el desarrollo en glándulas adenohipofisarias de ratas hembra y macho

En la glándula adenohipofisaria de ratas hembras en desarrollo se expresaron ambas variantes de splicing de la subunidad RGABA_{B1}, RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)} desde el día 4 postnatal hasta la adultez (Figura I.1). En cuanto a la subunidad RGABA_{B2} ésta fue pobremente detectable por esta metodología en este tejido a las edades estudiadas con la excepción de las membranas de ratas en proestro, donde se observaron niveles bajos (Figura I.1) pero al ser cuantificados no difirieron significativamente de las otras edades (12 días: 0.07 ± 0.02 vs. proestro: 0.10 ± 0.4 , ns).

Las subunidades RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)} presentaron su máxima expresión el día 4 y luego disminuyeron significativamente hacia la adultez (Figura I.2). Por otro lado al comparar sus niveles de expresión a lo largo del desarrollo observamos que la subunidad RGABA_{B(1a)} fue significativamente más abundante que la RGABA_{B(1b)} en los días 4 y 12 de vida; no observándose diferencias significativas en la expresión entre las variantes de RGABA_{B1} desde el día 20 postnatal en adelante en las membranas adenohipofisarias de hembras (Figura I.2).

En las hembras lactantes ambas subunidades RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)} pudieron ser cuantificadas, siendo sus expresiones similares a las de las hembras en proestro pero mientras que la subunidad RGABA_{B2} pudo ser detectada en las ratas en proestro, esta subunidad no fue detectable en las ratas lactantes.

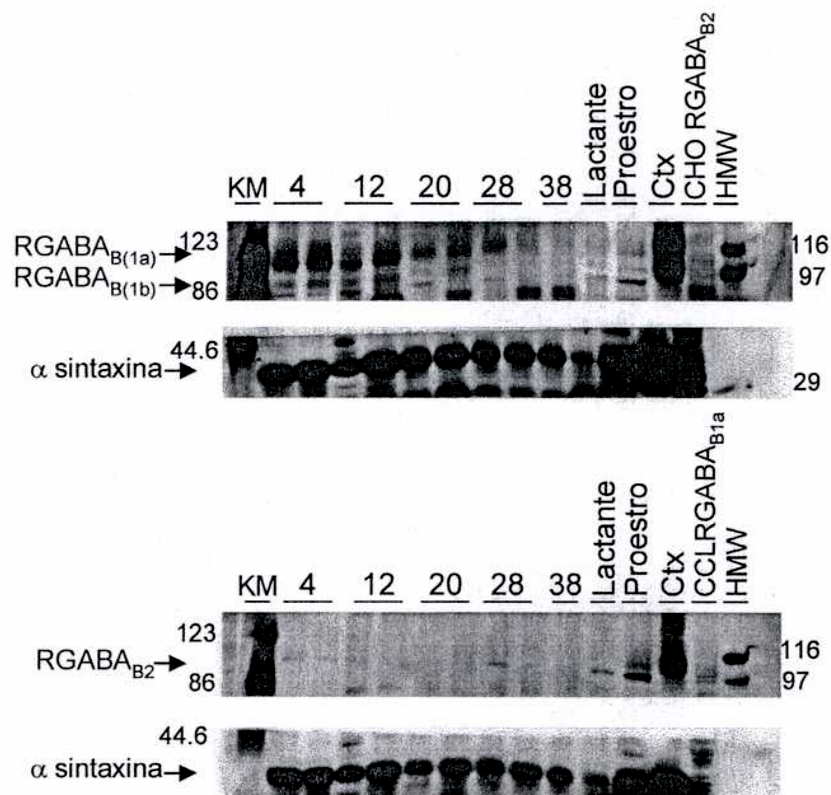


Figura I.1: Western blot representativo de las subunidades del RGABA_B en hipófisis anterior de ratas hembras durante el desarrollo (edades: 4, 12, 20, 28 y 38 días) y en ratas adultas lactantes y en proestro. Para esta y las siguientes figuras: KM y HMW, marcadores de peso molecular; Ctx, control positivo: corteza; CHO RGABA_{B2}, control negativo para los anticuerpos anti RGABA_{B1}: células CHO transfectadas con la subunidad RGABA_{B2}; CCLRGABA_{B1a}, control negativo para los anticuerpos anti RGABA_{B2}: células transfectadas con las subunidades RGABA_{B(1a)}; RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)}, bandas inmunoteñidas con Ab 174.1 (130 KDa y 100 KDa respectivamente); RGABA_{B2}, banda inmunoteñida con AbC22 (110 KDa); α syntaxina (parte inferior de cada *blot*, masa molecular aparente 31 KDa): es un control interno de carga proteica.

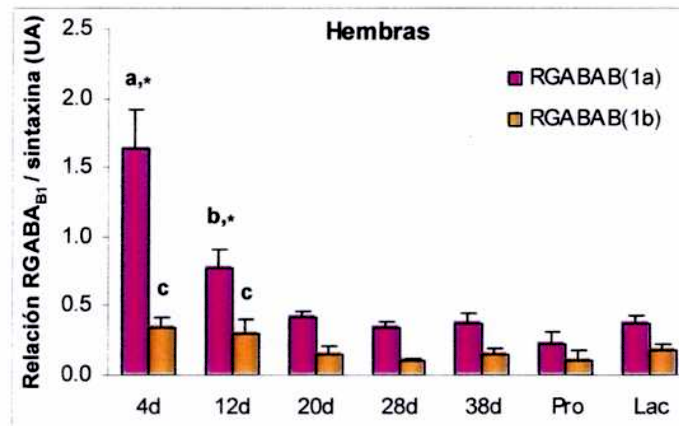


Figura I.2: Integración de los *immunoblots* de las subunidades RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)} de membranas adenohipofisarias de ratas hembras en desarrollo y adultas. Los resultados, en unidades arbitrarias (UA), son el promedio $\pm$ ES de 4-5 muestras independientes y están expresados como la relación de cada subunidad con respecto al control de α syntaxina. ANOVA en dos sentidos tomado como factores edad y subunidad: interacción: $p < 0.01$; a, significativamente diferente de los niveles a los 12 días y en adelante; b, significativamente diferente de los niveles a los 20 días y en adelante; c, significativamente diferente de los niveles a los 20 días y en adelante. Comparación entre la expresión de RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)} en hipófisis anterior de ratas hembras en desarrollo y adultas: *, significativamente diferente de RGABA_{B(1b)} a una cierta edad. Para todos los casos, $p < 0.05$ o menor.

En las glándulas adenohipofisarias de ratas machos en desarrollo la subunidad RGABA_{B(1a)} se expresó desde el día 4 postnatal hasta la adultez; por el contrario, y a diferencia de las hembras, la subunidad RGABA_{B(1b)} presentó una baja expresión en todas las edades estudiadas (Figura I.3). En cuanto a la subunidad RGABA_{B2}, al igual que en las hembras, ésta es también pobremente detectable a las edades estudiadas. Al analizar los *Western Blots*, se observó una disminución significativa en la expresión de RGABA_{B(1a)} a lo largo del desarrollo (Figura I.4), con una expresión significativamente más abundante en el día 4 que desde el día 20 en adelante.

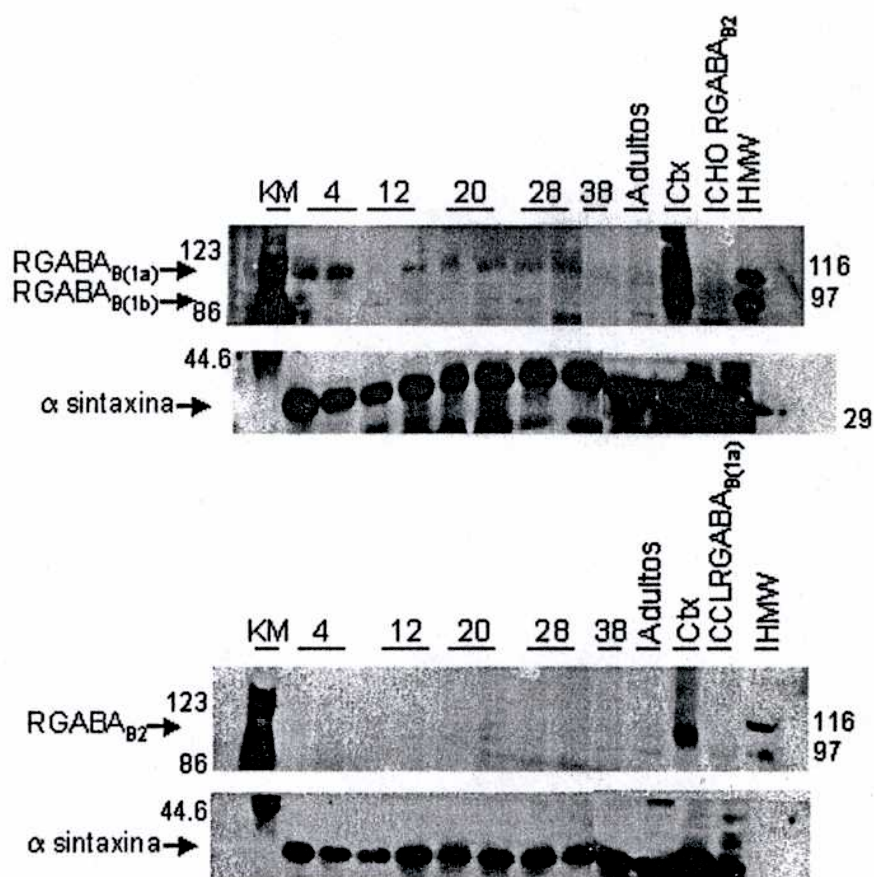


Figura I.3: Western blot representativo de las subunidades del RGABA_B en hipófisis anterior de ratas machos durante el desarrollo (edades: 4, 12, 20, 28 y 38 días) y en animales adultos.

La expresión de las subunidades del RGABA_B mostró un claro dimorfismo sexual en las adenohipófisis. Al comparar los niveles de expresión de la subunidad RGABA_{B(1a)} entre los sexos se observó que fue significativamente más abundante a los 4 y 12 días postnatales en hembras que en machos (Figura I.4). Por otro lado, mientras que la expresión de RGABA_{B(1b)}, aunque claramente menor que RGABA_{B(1a)}, fue detectable a lo largo del desarrollo en las hembras, en los machos su expresión fue menor en todas las edades estudiadas.

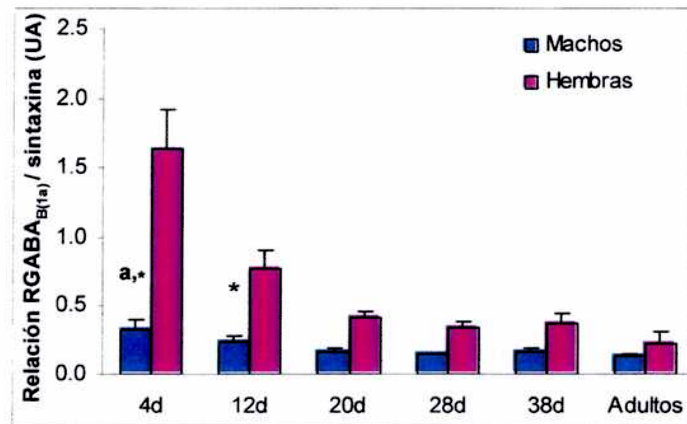


Figura I.4: Integración de los *immunoblots* de la subunidad RGABA_{B(1a)} de membranas adenohipofisarias de ratas hembras y machos en desarrollo y adultas. Los resultados, en unidades arbitrarias (UA), son el promedio $\pm$ ES de 4-5 muestras independientes. ANOVA en dos sentidos tomando como factores sexo y edad: interacción: $p < 0.01$; a, significativamente diferente de los niveles a los 20 días y en adelante; *, significativamente diferente las hembras a una cierta edad.

Ensayo de unión de radioligando al receptor GABA_B adenohipofisario en ratas hembras y machos en desarrollo

En los ensayos de unión de radioligando, el $^3\text{[H]}$ -Baclofen se unió de manera saturable, en ambos sexos, a las membranas adenohipofisarias en todas las edades estudiadas (Figura I.5, recuadros interiores). El análisis de Scatchard mostró un único sitio de unión de alta afinidad (Figura I.5).

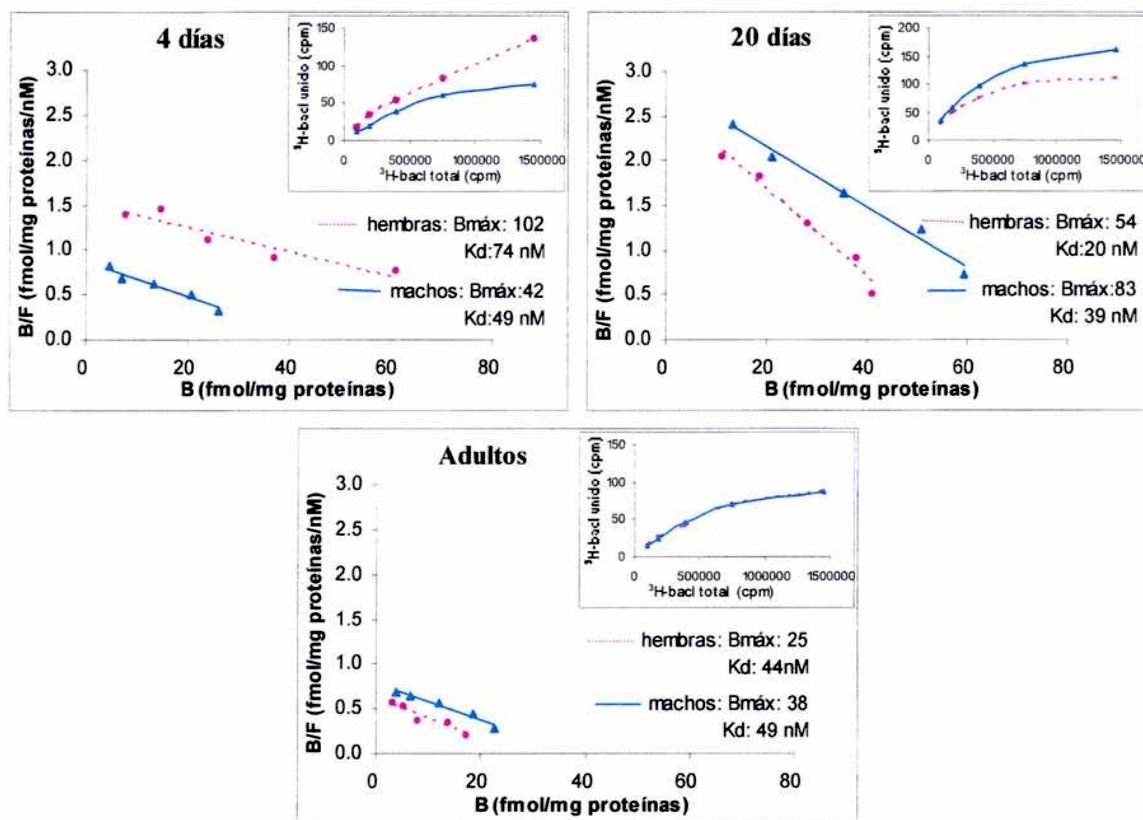


Figura I.5: Gráficos de Scatchard representativos de los estudios de unión al RGABA_B en membranas adenohipofisarias de ratas hembras y machos, en desarrollo y adultas. Los recuadros internos muestran al ligando unido específicamente como una función de las cpm.

Los valores de K_d promedio en los diferentes grupos variaron entre 30 y 57 nM, valores similares a los datos de la literatura para los RGABA_B de cerebro (Bowery et al., 1985), no observándose diferencias significativas en los valores de K_d entre los sexos ni entre las edades (Tabla I.1). En concordancia a lo observado por Western, los ensayos de radioreceptor mostraron que el número de sitios de unión GABA_B en la adenohipófisis de hembras de 4 días fue significativamente mayor que a los 20 días o en la adultez y también significativamente mayor que en machos de 4 días (Tabla I.1).

Además, los machos de 20 días mostraron un pequeño aumento en el número de sitios de unión con respecto a machos de 4 días, con significación marginal ($p < 0.06$) en

contraste a la disminución temporal en el número de receptores observados por *Western blot*.

En las ratas lactantes, el número de sitios de unión (31.4 ± 5.4 fmol/mg proteína, $n=7$) y el K_d (80.8 ± 24 nM, $n=3$) fueron similares a los de las ratas en proestro.

Bmax (fmol/mg proteína)	4 días	20 días	Adultas
Hembras	76.3 ± 7.4 (6) ^a (Kd: 57.1 ± 8.0 nM)	42.8 ± 6.7 (7) (Kd: 37.2 ± 7.1 nM)	29.1 ± 4.6 (6) (Kd: 48.1 ± 3.3)
Machos	33.5 ± 5.6 (6) (Kd: 38.8 ± 4.5 nM)	54.4 ± 6.4 (7) ^b (Kd: 30.2 ± 3.4 nM)	36.8 ± 5.7 (6) (Kd: 52.8 ± 8.2 nM)

Tabla I.1: Unión de ^3H -Baclofen a membranas adenohipofisarias de ratas hembras y machos en desarrollo y adultas. Bmáx: número de sitios de unión determinados por análisis de saturación. ANOVA en dos sentidos tomando como factores sexo y edad: Interacción: $p < 0.05$, a: significativamente diferente de ratas hembras de 20 días y adultas y de ratas machos de 4 días y adultas, $p < 0.05$. b: diferencia marginalmente significativa con respecto a ratas machos de 4 días, $p < 0.06$. Kd: valores promedio de tres experimentos de Scatchard. ANOVA en dos sentidos tomando como factores sexo y edad: ns. Número entre paréntesis: número de muestras.

Expresión de las subunidades del receptor GABA_B durante el desarrollo en hipotálamos de ratas hembra y macho.

Las subunidades RGABA_{B1} y RGABA_{B2} se expresan en los hipotálamos de ratas hembras y machos desde el día 4 postnatal hasta la adultez.

En las hembras, ambas variantes de *splicing* de la subunidad RGABA_{B1} presentan su máxima expresión en el día 4 y disminuyen paulatinamente, alcanzado los niveles de los animales adultos a los 28 días de vida para $\text{RGABA}_{B(1a)}$ y a los 20 días para $\text{RGABA}_{B(1b)}$ (Figura I.6). Por otro lado al comparar sus niveles de expresión a lo largo del desarrollo observamos diferencias significativas entre estas variantes sólo al día 38

de vida, siendo en este caso la subunidad $RGABA_{B(1b)}$ significativamente más abundante que la $RGABA_{B(1a)}$ (Figura I.6).

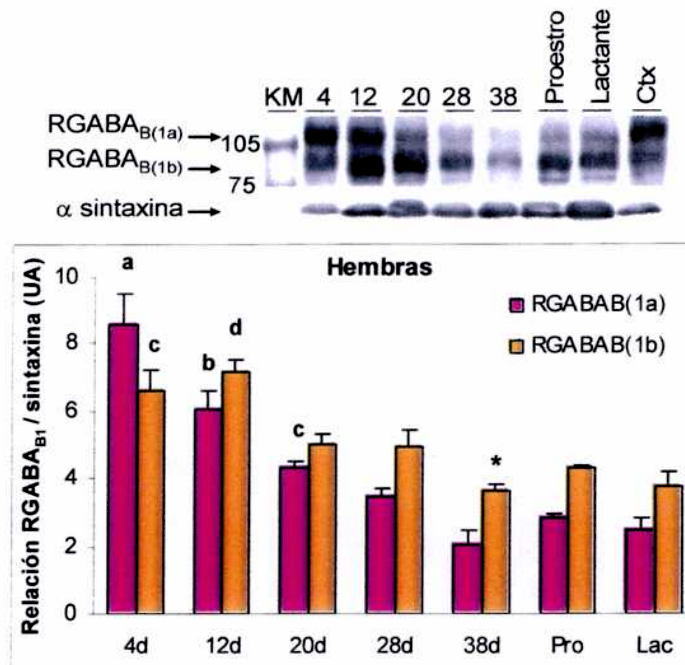


Figura I.6: Integración de los *immunoblots* de las subunidades $RGABA_{B(1a)}$ y $RGABA_{B(1b)}$ de membranas hipotalámicas de ratas hembras en desarrollo y adultas. Los resultados, en unidades arbitrarias (UA), son el promedio $\pm$ ES de 4-6 muestras independientes y están expresados como la relación de cada subunidad con respecto al control de α syntaxina. ANOVA en dos sentidos tomando como factores subunidades y edad. Interacción significativa: $p < 0.001$; a, significativamente diferente de los niveles a los 20 días y en adelante; b, significativamente diferente de los niveles a los 28 días y en adelante; c, significativamente diferente de los niveles a los 38 días y en adelante; d: significativamente diferente de los niveles a los 20 y 38 días y en adelante. Comparación entre la expresión de $RGABA_{B(1a)}$ y $RGABA_{B(1b)}$: *, significativamente diferente de $RGABA_{B(1a)}$ a una cierta edad. Para todos los casos, $p < 0.05$ o menor.

En los machos, la expresión de ambas variantes de la subunidad $RGABA_{B1}$ del receptor también es mayor al día 4 postnatal y disminuye hacia la adultez; pero a diferencia de las hembras, su disminución es más gradual (Figura I.7). Las ratas machos de 20 días ya presentan los niveles adultos tanto de $RGABA_{B(1a)}$ como de $RGABA_{B(1b)}$. Al comparar los niveles de expresión de estas variantes durante la ontogenia no observamos diferencias significativas a ninguna de las edades estudiadas.

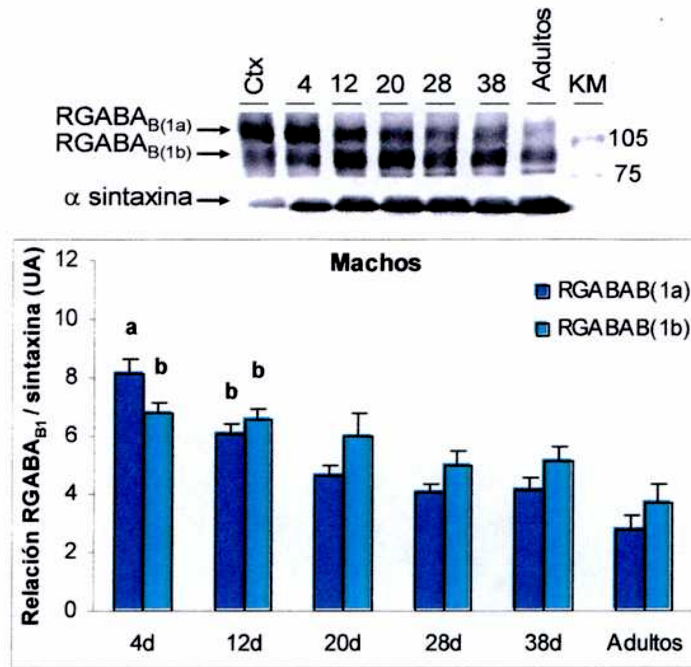


Figura I.7: Integración de los *immunoblots* de las subunidades RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)} de membranas hipotalámicas de ratas machos en desarrollo y adultas. Los resultados (UA), son el promedio $\pm$ ES de 4-6 muestras independientes y están expresados como la relación de cada subunidad con respecto al control de α sintaxina. ANOVA en dos sentidos tomando como factores subunidades y edad. Interacción significativa: $p < 0.02$; a, significativamente diferente de los niveles a los 20 días y en adelante; b, significativamente diferente de los niveles de adultos. Para todos los casos, $p < 0.05$ o menor.

Luego comparamos los niveles de expresión de las variantes de RGABA_{B1} entre las membranas hipotalámicas de hembras y machos. En el caso de RGABA_{B(1a)} encontramos diferencias sólo al día 38 de vida, siendo su expresión significativamente más abundante en los machos a dicha edad (Figura I.8). En cambio para RGABA_{B(1b)} no se observaron diferencias en los niveles de expresión entre los sexos durante el desarrollo postnatal (Figura I.9).

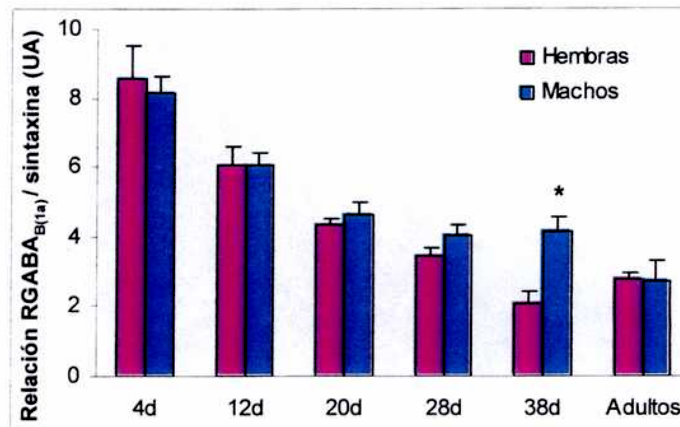


Figura I.8: Comparación de los niveles de expresión de la subunidad $RGABA_{B(1a)}$ entre membranas hipotalámicas de ratas hembras y machos durante la ontogenia. Los resultados (UA), son el promedio $\pm$ ES de 4-6 muestras independientes. ANOVA en dos sentidos. Interacción significativa: $p < 0.002$; *, significativamente diferente las hembras a una cierta edad.

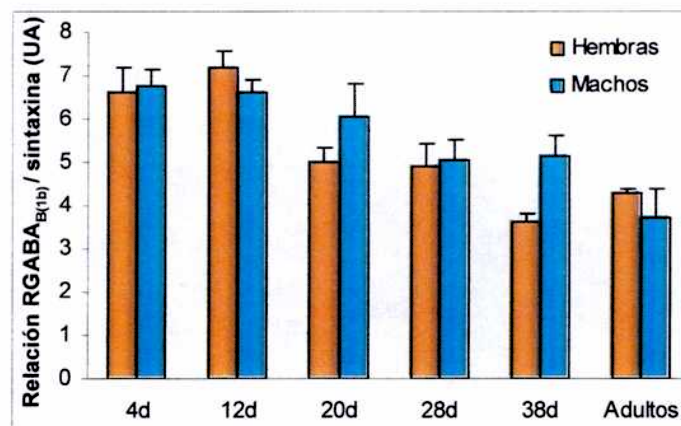


Figura I.9: Comparación de los niveles de expresión de la subunidad $RGABA_{B(1b)}$ entre membranas hipotalámicas de ratas hembras y machos durante la ontogenia. Los resultados (UA), son el promedio $\pm$ ES de 4-6 muestras independientes. ANOVA en dos sentidos. Interacción: ns.

En cuanto a la subunidad $RGABA_{B2}$, a diferencia de lo obtenido en la adenohipófisis, ésta fue detectable en las membranas hipotalámicas de hembras y de machos a las todas edades estudiadas (Figura I.10). Al analizar los *Western Blots*, no se observaron diferencias significativas en sus niveles de expresión entre los sexos. La

subunidad RGABA_{B2} presentó una disminución significativa en la expresión a lo largo del desarrollo, con su nivel máximo al día 12 de vida y alcanzando a los 38 días los niveles de adultos.

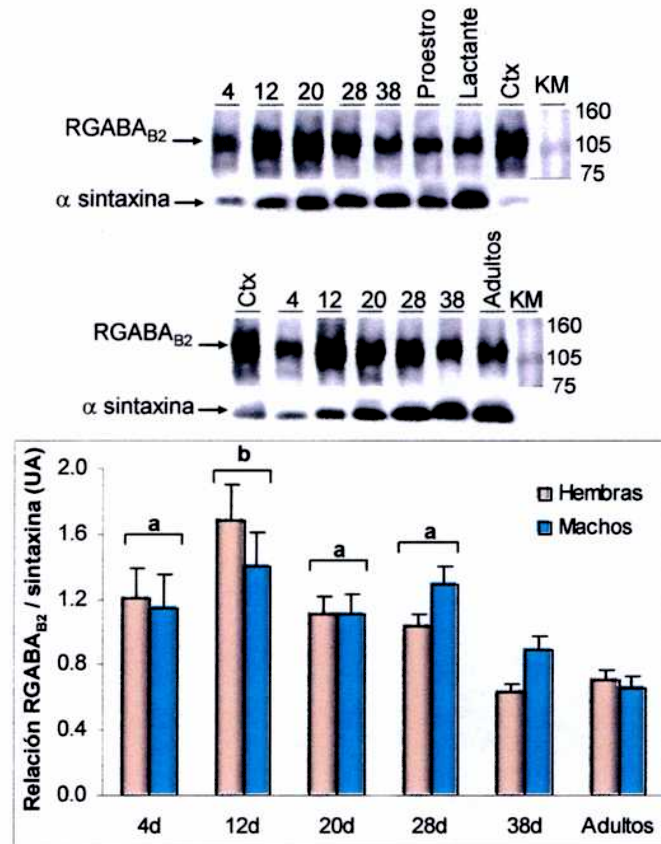


Figura I.10: Integración de los *immunoblots* de la subunidad RGABA_{B2} de membranas hipotalámicas de ratas hembras y machos en desarrollo y adultas. Los resultados (AU), son el promedio $\pm$ ES de 4-6 muestras independientes. ANOVA en dos sentidos. Interacción: ns; factor sexo: ns; factor edad: $p < 0.001$. a, significativamente diferente de los niveles de adultas; b, significativamente diferente de los niveles de 38 días y adultas.

En cuanto a las ratas lactantes, las variantes RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)} pudieron ser cuantificadas en las membranas hipotalámicas, siendo sus expresiones similares a las de las hembras en proestro (Figura I.6). La subunidad RGABA_{B2} también pudo ser detectada en las ratas lactantes presentando niveles semejantes a los de las hembras en proestro (proestro: 0.705 ± 0.060 vs lactantes: 0.667 ± 0.092 , ns).

Discusión

Esta es la primera demostración de la expresión ontogénica de las subunidades del $RGABA_B$ en la pituitaria anterior de ratas hembras y machos en desarrollo. Algunos reportes habían descrito la expresión de las subunidades $RGABA_{B1}$ y $RGABA_{B2}$ en melanotopos de ratas del lóbulo intermedio (Morris et al., 1999; Shibuya et al., 1999)}. La subunidad $RGABA_{B(1a)}$ es la principal subunidad que se expresa en las hipófisis anteriores de hembras y machos. La expresión de $RGABA_{B(1a)}$ disminuye gradualmente a lo largo del desarrollo postnatal alcanzando sus niveles más bajos en los animales adultos en ambos sexos. Más aún, la subunidad $RGABA_{B(1a)}$ es significativamente mayor en las hembras que en los machos en etapas tempranas del desarrollo. Además, en las hembras la expresión de $RGABA_{B(1b)}$ también disminuye a lo largo del desarrollo y fue mucho menos abundante que $RGABA_{B(1a)}$ a los 4 y 12 días de vida. Por lo contrario, en los machos esta subunidad mostró baja expresión. Estos resultados concuerdan con los descritos por Malitschek y col. (Malitschek et al., 1998) donde muestran los niveles de expresión más altos de las subunidades $RGABA_{B1}$ a edades tempranas postnatales en algunas áreas del SNC como la médula espinal, la corteza y el cerebelo. Además, en la corteza $RGABA_{B(1a)}$ es la principal subunidad expresada en edades tempranas postnatales pero, mientras que en la adenohipófisis de hembras la substancial diferencia entre $RGABA_{B(1a)}$ y $RGABA_{B(1b)}$ se pierde hacia la adultez, en la corteza $RGABA_{B(1b)}$ aparece como la principal subunidad expresada en las ratas adultas (Malitschek et al., 1998), observándose resultados similares en cerebros enteros de ratas (Fritschy et al., 1999a; Fritschy et al., 1999b; Fritschy et al., 2004).

La diferencia significativa en la intensidad de expresión de $RGABA_{B(1a)}$ entre hembras y machos y la baja expresión de la subunidad $RGABA_{B(1b)}$ en machos, sugiere

una expresión sexualmente dimórfica de las subunidades RGABA_B durante la ontogenia en la adenohipófisis de rata. Se han descrito extensivamente diferencias sexuales en la función de la pituitaria y en las estructuras del sistema nervioso involucradas en el control de la secreción adenohipofisaria (Becu-Villalobos and Libertun, 1995; Becu-Villalobos et al., 1997), las que señalan el rol crítico de los esteroides sexuales neonatales en estos eventos.

La subunidad RGABA_{B2} fue prácticamente indetectable en las membranas adenohipofisarias en cualquier sexo a cualquiera de las edades estudiadas. La presencia de expresión de la subunidad RGABA_{B1} en ausencia de RGABA_{B2} fue también descrita en otros tejidos como ser: *striatum* humano (Martin et al., 1999) y caudado-putamen de rata (Bowery, 1999; Clark et al., 2000). Por otro lado, niveles muy bajos de expresión de RGABA_{B2} fueron detectados en el HTMB, el *septum* y el tallo cerebral de la rata (Clark et al., 2000). La falta de detección de la subunidad RGABA_{B2} en la hipófisis puede deberse a que RGABA_{B2} se exprese en muy bajos niveles en esta glándula, los cuales no son detectables por encontrarse por debajo de la sensibilidad del método utilizado, o a que en este tejido se exprese una subunidad del RGABA_B aún no identificada. Con relación a esta última hipótesis, en humanos se han hallado tres variantes de splicing de la subunidad RGABA_{B2} las cuales difieren en la región carboxi terminal, zona contra la que está dirigido el anticuerpo que nosotros usamos para detectar RGABA_{B2} en los *immunoblots*. Se ha demostrado también que RGABA_{B1} puede interactuar específicamente con otras proteínas adicionales, las cuales jugarían un papel importante en la plasticidad sináptica (Vernon et al., 1999). Por lo tanto, se podría postular que otra proteína asociada esté complementando funcionalmente a RGABA_{B1} en la adenohipófisis, ya que se sabe que RGABA_{B1} no logra alcanzar la membrana

plasmática o ejercer completamente su acción en ausencia de RGABA_{B2} (Couve et al., 1998; Martin et al., 1999; Mohler and Fritschy, 1999; Ng et al., 1999).

Los ensayos de radiorreceptor mostraron que el número de RGABA_B en la adenohipófisis de hembras disminuye significativamente durante la ontogenia y que es más abundante que en los machos a edades tempranas del desarrollo. Esto coincide con nuestros resultados de los *Western blots*. Mientras que en los machos se observó una disminución temporal en el número de los RGABA_B por el análisis de *Western blot*, esta disminución no fue detectada por los estudios de unión del ³[H]-Baclofen. Por lo contrario, observamos un pequeño aumento en el número de sitios en los machos al día 20 post-nacimiento. Una diferencia en la sensibilidad de los métodos empleados o, alternativamente, que otras subunidades RGABA_B, no detectables por el antisuero empleado en los *Western blots*, sean cuantificables en los estudios de unión podrían dar cuenta de esta discrepancia. En ratas, por ejemplo, se han identificado nuevas variantes de splicing de RGABA_{B1}, RGABA_{B(1c-g)}, (Isomoto et al., 1998), algunas de las cuales difieren en sus extremos C-terminales, pudiendo no ser reconocidas, por lo tanto, por el anticuerpo utilizado en estos experimentos.

Con respecto a las diferencias encontradas en la expresión del RGABA_B, entre machos y hembras, ya se había descrito una diferencia sexual en el número total de sitios de unión de GABA en las pituitarias de ratas adultas, siendo la unión sólo detectable en hembras (Fiszer de Plazas et al., 1983). Por otro lado, el número de RGABA_B en membranas adenohipofisarias de ratas machos adultas determinados en nuestro estudio es similar al reportado por Anderson y Mitchell (Anderson and Mitchell, 1986b). Los valores de K_d de los RGABA_B de la pituitaria anterior son similares a los de los RGABA_B del SNC (Bowery et al., 1985) y no varían

significativamente con el sexo o la edad. La ausencia de una variación significativa en el Kd a lo largo del desarrollo difiere de resultados en la corteza donde se mostró que la afinidad de este receptor aumenta gradualmente desde el nacimiento hacia la adultez, paralelamente a la disminución gradual en el número de sitios (Malitschek et al., 1998).

Con respecto a la expresión del RGABA_B en el hipotálamo de rata, éstas son las primeras evidencias de la distribución ontogénica de sus subunidades en machos y hembras. Al analizar esta expresión se observan algunas similitudes y algunas diferencias con respecto a la expresión hipofisaria. En esta área del cerebro, críticamente comprometida en la regulación hipofisaria, la expresión de las dos variantes de *splicing* de la subunidad RGABA_{B1} al igual que la subunidad RGABA_{B2} muestran una disminución de la expresión a lo largo de la ontogenia, encontrándose los valores de adulto alrededor del día 20 de vida, semejante a lo observado en la hipófisis anterior. Esta disminución de la expresión a lo largo del desarrollo concuerda con lo descrito para otras áreas del cerebro, por ejemplo la médula espinal, donde se ha descrito que todas las subunidades se comportan de esta manera (Malitschek et al., 1998; Kaupmann et al., 1998). En otras áreas como el cerebelo y la corteza se observan una disminución de la expresión ontogénica de RGABA_{B1} mientras que RGABA_{B2} se mantiene en altos niveles de expresión a todas las edades estudiadas (Malitschek et al., 1998; Kaupmann et al., 1998).

Con respecto a los niveles de expresión de las dos variantes de *splicing* de RGABA_{B1}, se había postulado que en cerebro estaban diferencialmente reguladas siendo RGABA_{B(1a)} la variante preponderante al nacimiento, mientras que la variante RGABA_{B(1b)} era la mayoritaria en la adultez (Benke et al., 1999; Fritschy et al., 1999b). Al analizar áreas específicas del cerebro, como la corteza, también se observó este

patrón de inversión en la abundancia de cada variante (Malitschek et al., 1998), mientras que esto no se observa en otras áreas como cerebelo, médula espinal o cerebro medio. En hipotálamo se observa una tendencia hacia una mayor expresión de la variante $RGABA_{B(1a)}$ a los 4 días de edad, que rápidamente se invierte siendo la variante $RGABA_{B(1b)}$ la preponderante a los 38 días en las hembras. Los machos muestran un patrón similar, sin alcanzarse significación estadística a ninguna edad. Esta inversión en los niveles de expresión de ambas variantes es diferente a lo observado en la hipófisis, donde $RGABA_{B(1a)}$ pareciera ser siempre la variante predominante. Otra marcada diferencia con la expresión de este receptor en la hipófisis es la diferencia sexual en los niveles de expresión que se observa en dicha glándula, siendo $RGABA_{B1}$ mayor en las hembras que en los machos en etapas tempranas de desarrollo. Dicha diferencia sexual temprana está ausente en el hipotálamo. La única diferencia sexual observada es a los 38 días donde la variante $RGABA_{B(1a)}$ es más abundante en membranas hipotalámicas de machos que de hembras. Es llamativo que la subunidad $RGABA_{B(1a)}$ presente niveles tan bajos en las hembras de 38 días, siendo significativamente menores que la subunidad $RGABA_{B(1b)}$ y que en los machos de esa edad. Es importante señalar que los 38 días de vida corresponden a un período crítico en las hembras de nuestra colonia, siendo el momento en el que ocurre la eclosión puberal (ver resultados del Capítulo 2). Contrariamente a lo observado en hipófisis, la subunidad $RGABA_{B2}$ es ampliamente expresada en hipotálamo, de acuerdo con resultados previos de esta área en animales adultos (Clark et al., 2000). A diferencia de la hipófisis, donde planteamos la posibilidad de que la subunidad $RGABA_{B1}$ se acople a otras proteínas chaperonas para alcanzar la membrana plasmática y la funcionalidad, en el hipotálamo ambas subunidades, $RGABA_{B1}$ y $RGABA_{B2}$, están presentes para conformar el receptor activo.

En resumen, estos resultados reportan por primera vez la expresión de las subunidades del RGABA_B en la pituitaria anterior. La principal subunidad expresada es la RGABA_{B(1a)}; ésta disminuyó a lo largo del desarrollo postnatal en ambos sexos y fue más abundante en hembras que en machos en estadios tempranos del desarrollo. La subunidad RGABA_{B(1b)} siguió un patrón de expresión similar. Sorprendentemente, la detección de la expresión de RGABA_{B2} fue insignificante en ambos sexos. No se observaron variaciones en los valores de Kd a lo largo de la ontogenia. Una clara expresión sexualmente dimórfica de las subunidades del RGABA_B fue determinada durante la ontogenia en la pituitaria anterior. El patrón ontogénico de expresión de las variantes de *splicing* RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)} y de la subunidad RGABA_{B2} en hipotálamo es similar en machos y hembras. Aún más, en líneas generales es semejante al observado para ambas variantes de RGABA_{B1} en hipófisis anterior y a lo reportado para otras áreas del SNC.

CAPÍTULO II:

**Efecto de la diferenciación sexual sobre la
expresión de la subunidad RGABA_{B1} del
receptor GABA_{B}**

Introducción

Varias funciones que son controladas por el cerebro, se expresan diferencialmente en machos y hembras, siendo las más evidentes aquellas involucradas en la fisiología reproductiva (Arnold, 1984; Becu-Villalobos et al., 1997; Fitch and Denenberg, 1998).

Alteraciones perinatales de los niveles endógenos de las hormonas gonadales inducen cambios en características fisiológicas, neuroanatómicas, moleculares y comportamentales sexualmente dimórficas, independientemente del sexo genético (Roselli and Klosterman, 1998; Tobet, 2002; Gorski, 2002; Simerly, 2002; Quadros et al., 2002b; Casto et al., 2003; Gu et al., 2003).

Como mencionáramos anteriormente, es bien conocido que en las ratas hay un período sensitivo en el desarrollo durante el cual la diferenciación sexual procede irreversiblemente bajo la influencia de las hormonas sexuales. Los altos niveles de andrógenos secretados tanto prenatalmente por los testículos fetales alrededor del día gestacional 18 como aquellos secretados tempranamente en el desarrollo postnatal (Resko et al., 1968; Hopkins and Gregory, 1977; Weisz and Ward, 1980) masculinizan y defeminizan permanentemente substratos neuronales que controlan funciones cerebrales sexualmente dimórficas (Ward, 1972; Ward, 1980; Becu-Villalobos et al., 1997). Se ha demostrado que los andrógenos fetales testiculares también ejercen influencias masculinizantes sobre el comportamiento (Fitch and Denenberg, 1998) y la morfología genital (Jost et al., 1973). En cambio, los efectos de los esteroides sobre los patrones de secreción femeninos de las gonadotrofinas y el comportamiento sexual femenino son principalmente postnatales (Arnold, 1984). Aunque el tiempo de acción de los esteroides para la masculinización y la defeminización es decisivo, existiendo más de un período crítico, como se menciona anteriormente, bajo condiciones

experimentales estos procesos también dependen del tipo de andrógeno y de las dosis usadas (Gorski, 1968; Luttge and Whalen, 1970; Sheridan et al., 1973; McDonald and Doughty, 1974).

Las características anatómicas y comportamentales sexualmente divergentes son consecuencia de cambios a nivel molecular, los cuales surgen del encendido o apagado de la expresión génica y se reflejan, por ejemplo, como diferencias en los niveles de expresión de receptores, enzimas, factores de transcripción, etc (Roselli and Klosterman, 1998; Perrot-Sinal et al., 2001; Carrer and Cambiaso, 2002; Tobet, 2002; Auger et al., 2002; Orikasa et al., 2002; Arrieta et al., 2003; Auger, 2003).

Debido a la expresión sexualmente dimórfica de los RGABA_B en estadios tempranos del desarrollo en la pituitaria, demostrada en el capítulo anterior, y al papel central que desempeñan los esteroides sexuales en la determinación de patrones de expresión sexo-específicos, decidimos estudiar el efecto de la diferenciación sexual sobre la expresión de las subunidades del RGABA_B en esta glándula. Además, dado que GABA es capaz de modular la expresión de sus receptores y su concentración también es influenciada por los esteroides sexuales, se determinaron los niveles de GABA y otros neurotransmisores en los hipótalamos de los diferentes grupos.

Materiales y Métodos

Animales

Primer diseño experimental

Las ratas hembras fueron apareadas en proestro y se consideró día 1 de gestación cuando un botón vaginal de esperma se observó al día siguiente. Ellas fueron puestas en cajas individuales antes del parto. El día de nacimiento (designado día 1) se determinó el sexo de las crías. Para estos estudios, se seleccionaron crías de 8 y 15 días porque, según lo observado en el capítulo anterior, esperábamos encontrar a estas edades niveles altos de la expresión del $RGABA_{B1}$ en ambos sexos y la diferencia sexual en los niveles de expresión. Además, se seleccionaron estas edades para usar la menor cantidad posible de animales, ya que varias pituitarias eran necesarias por cada muestra de *Western blot* (ver capítulo anterior). Dentro de las primeras 24 horas de vida cada cría fue asignada al azar en algún grupo de tratamiento. Las hembras fueron inyectadas subcutáneamente (s.c.) el día 1 con 0.05 ml de vehículo: aceite de ricino (hembras controles de 8 y 15 días: 8H y 15H) ó con una única dosis de 100 µg de propionato de testosterona (TP) en 0.05ml de aceite de ricino (hembras androgenizadas neonatalmente: 8H100TP y 15H100TP) (Becu-Villalobos et al., 1984). Los machos fueron castrados (castración neonatal: 8MC y 15MC) ó castrados ficticiamente (machos controles: 8M y 15M) el día 1. La castración neonatal (real y ficticia) se realizó bajo anestesia por frío. Las crías fueron luego calentadas e inmediatamente devueltas a sus madres. Se permitió que las crías permanecieran con sus madres hasta el día del experimento. Los animales fueron sacrificados por decapitación a los 8 ó 15 días de edad, temprano en la mañana, alrededor de las 9.00 AM, para evitar variaciones

circadianas. Se recolectó sangre troncal para la posterior dosificación de las hormonas séricas y se recolectaron las adenohipófisis, hipotálamos y cortezas que se congelaron a -70°C.

Segundo diseño experimental

En este caso sólo se utilizaron animales de 8 días, ya que el primer diseño experimental mostró que los animales de 15 días ya habían alcanzado los bajos niveles de expresión, típicos de adultos. Ratas con fecha de preñez conocida (mantenidas bajo condiciones estándar) fueron inyectadas s.c. al azar con aceite de ricino con 10% de etanol (control de vehículo) o con Flutamida (Flut: antagonista del receptor de andrógenos, 25 mg/kg de peso corporal ajustados diariamente en base al peso corporal, preparado disolviendo primero la droga en etanol absoluto, donde se disolvió completamente, y luego diluyendo en aceite de ricino). Los tratamientos fueron administrados una vez al día desde el día 17 de gestación hasta el día previo al nacimiento (Fitch et al., 1991). Dentro de las 24 horas luego del nacimiento, se determinó el sexo de las crías. En el caso de las crías recién nacidas de madres tratadas con Flut, los machos no eran fácilmente distinguibles de las hembras ya que todos tenían clítoris, uretra y pezones. Para diferenciar entre ellos, la aplicación de presión manual en el abdomen resultó en la eversión inmediata y reversible de los conos gubernaculares permitiendo la distinción inequívoca entre machos y hembras (Van der Schoot, 1992). Los conos gubernaculares son específicos de machos, son estructuras similares a papilas creciendo en la región abdominal inguinal hacia el final de la vida prenatal y son un prerrequisito para el descenso postnatal de los testículos; su desarrollo no es alterado por el tratamiento con Flut (Van der Schoot, 1992). Las hembras recién nacidas, de madre inyectadas con vehículo, fueron inyectadas sc con TP el día 1 de vida (dosis única de 100 µg en 0.05 ml de aceite de ricino: 8H100TP), o recibieron una

inyección diaria de 1µg TP en 0.05 ml de aceite de ricino (8H1TP) o 0.05 ml del vehículo aceite de ricino (8H) los días 1-4 de edad, siguiendo el protocolo de androgenización descrito por McDonald y Doughty (McDonald and Doughty, 1974). Las crías recién nacidas de madres inyectadas con Flut no recibieron otro tratamiento (8H-Flut). Los machos nacidos de madres inyectadas con vehículo o con Flut fueron castrados (8MC o 8MC-Flut) o castrados ficticiamente (8M y 8M-Flut) el día del nacimiento. Las madres con sus crías fueron mantenidas en cajas individuales. Los animales fueron sacrificados por decapitación, temprano en la mañana. Se recolectó sangre troncal para la posterior dosificación de las hormonas séricas y se recolectaron las adenohipófisis, hipotálamos y cortezas que se congelaron a -70°C.

Tercer diseño experimental

Un grupo de hembras controles (H), hembras inyectadas con 100 µg TP (H100TP) o 1 µg TP (H1TP), como en el segundo diseño experimental, se dejaron crecer y se destetaron en el día 21. A partir del día 28 de vida, cada animal fue pesado y examinado diariamente para determinar la apertura vaginal. Ningún animal perteneciente al grupo de H100TP presentó apertura vaginal. Entre los días 40 y 75 de edad se realizaron los extendidos vaginales de los grupos H1TP y H por lo menos seis veces por semana. Finalmente, los animales de cada condición de tratamiento fueron sacrificados por decapitación, a los aproximadamente 75 días de vida, ya sea temprano a la mañana, alrededor de las 9.00 AM o luego en la tarde, alrededor de las 5.00 PM (H fueron sacrificadas en proestro) y se recolectó la sangre troncal para las determinaciones hormonales.

Ciclos regulares: fueron definidos como la aparición de 3 ciclos consecutivos de 4-5 días. El comienzo de los ciclos regulares en las hembras controles (H) fue detectado

entre los días 50 y 60 de vida. El anestro, una indicación de la pérdida de la capacidad de la liberación cíclica de gonadotrofinas en cantidades suficientes para la ovulación, fue definido como la presencia de extendidos escamosos, similares a los extendidos vaginales de hembras en estro (células epiteliales escamosas), durante por lo menos quince días consecutivos. La apertura vaginal como *pinhole* (McDonald and Doughty, 1974) fue definido como la aparición de un pequeño orificio permitiendo o no la introducción parcial de la pipeta de plástico (2 mm de diámetro) para tomar una muestra del fluido vaginal.

Obtención de membranas

Las membranas adenohipofisarias fueron preparadas según el protocolo descrito en el capítulo anterior.

Análisis de *Western blot*

Los análisis de los niveles de expresión de las subunidades del RGABA_{B1} mediante la técnica de *Western blot* se realizaron según lo descrito en el capítulo anterior. Dada la pobre detección de la subunidad RGABA_{B2} obtenida previamente, esta subunidad no fue medida por esta técnica en este capítulo.

Determinación de neurotransmisores aminoacídicos por HPLC

Se determinaron los niveles de glutamato, GABA, aspartato y taurina en los hipotálamos y en la corteza fronto-parietal de los animales del segundo diseño experimental: 8H, 8H1TP, 8H100TP, 8H-Flut, 8M, 8MC, 8M-Flut y 8MC-Flut. Estos aminoácidos fueron determinados usando el procedimiento descrito previamente por Saller y col. con mínimas modificaciones (Saller and Czupryna, 1989). Se utilizó un

sistema HPLC que consistió en un módulo programable de solventes (bombas y mezclador) Modelo 125 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, U.S.A.), una columna de fase reversa de 5- μ m, 25 cm X 4.6 mm Ultrasphere® ODS (Beckman), un detector UV programable Modelo 166 (254 nm) (Beckman) y el programa System Gold® (Beckman). La fase móvil fue una mezcla de agua-acetonitrilo (82:18, v/v) conteniendo 0.15% (v/v) ácido fosfórico. Se obtuvieron derivados dansilados de los estándares y de las muestras. Estos fueron evaporados a sequedad en un concentrador Speed-Vac Savant (Savant Instruments, Hicksville, NY, U.S.A.) y los residuos secos fueron vigorosamente resuspendidos en 200 μ l de la fase móvil usando un agitador mecánico y colocados en un baño ultrasónico. Finalmente se centrifugaron los tubos a 13000 g por 3 min. para remover la materia particulada antes de inyectar alícuotas de 20 μ l de los sobrenadantes en el sistema de HPLC.

Dosificación Hormonal

Las muestras de sangre troncal colectadas al sacrificar los animales se las dejaron coagular, se centrifugaron y los sueros fueron guardados a -20 °C hasta la realización de las mediciones.

Radioinmunoanálisis (RIA) para hormonas proteicas

Los niveles de LH y FSH séricos fueron determinados por radioinmunoanálisis (RIA) por doble anticuerpo (Libertun, 1980). A continuación se detalla el protocolo para LH, siendo éste esencialmente el mismo para las otras hormonas proteicas medidas en éste y otros capítulos.

Hormona Luteinizante (LH)

La hormona LH se cuantificó usando el kit de reactivos provistos por el NIDDK.

Marcación: Se utilizó 2.5 µg de LH (NIDDK-rLH-I-10) purificada, aislada de glándulas hipofisarias de rata. La hormona liofilizada fue disuelta en solución de PBS (*buffer* fosfosalino compuesto por *buffer* fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M y azida sódica 0.01% pH final 7.4) a una concentración final de 100 µg/ml. La marcación se efectuó en tubos de vidrio, bajo campana. Se usó ^{125}I (NEN), libre de portador y apto para marcar proteínas. Las soluciones empleadas fueron: *buffer* fosfato 0.5 M pH 7.5; *buffer* fosfato 0.05 M pH 7.5; solución de transferencia: 100 mg de IK, 0.8 g de sacarosa, 10 ml de H_2O csp; solución de cloramina-T: 100 mg/100 ml de *buffer* fosfato 0.05 M preparada inmediatamente antes de su uso; solución de metabisulfito de sodio: 100 mg/10 ml de *buffer* fosfato 0.05 M.

La columna de cromatografía usada para la separación de la hormona marcada del ^{125}I libre fue de Sephadex G-50, en *buffer* fosfato 0.05 M. Los sitios activos de dicha columna fueron saturados previamente mediante el pasaje de 1 ml de *buffer* fosfosalino con EDTA 0.05 M y 2% de BSA.

Procedimiento de marcación: a la hormona disuelta en PBS se le añadieron 10 µl de *buffer* fosfato 0.5 M y luego 0.5 mCi de ^{125}I . La oxidación se efectuó con 11.25 µl de la solución de cloramina-T, bajo agitación suave durante 60 segundos. La reacción fue detenida con 6.25 µl de solución de metabisulfito de sodio. Luego se agregaron 100 µl de la solución de transferencia (que verificó si hubo un exceso de agente oxidante), y el contenido del tubo de marcación fue pasado por la columna de separación. El *buffer* de elución fue el *buffer* fosfato 0.05 M. Se recogieron aproximadamente 500 µl de eluido por tubo, y se leyeron en un contador gamma. Con las columnas empleadas se obtuvo

una buena separación de los picos de hormona marcada, que sale con el V_0 y de ^{125}I , no incorporado a la proteína, que es incluido en la columna. Los mejores tubos de la marcación se reunieron y se congelaron en alícuotas para su posterior uso en RIA.

Radioinmunoanálisis: El primer antisuero contra LH de rata fue NIDDK-Anti-Rat-LH-RIA-11 obtenido al inmunizar conejos con LH de rata altamente purificada semejante a la NIDDK-rLH-I-10. Se diluyó en PBS, EDTA 0.05 M con 2% de suero de conejo normal, pH 7.4, a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo. La dilución inicial fue de 1:196.000 y la final de 1: 980.000. El estándar de referencia fue LH purificada de hipófisis de rata (NIDDK-Rat-LH-RP3), con un mínimo de contaminante de FSH y TSH. La curva de concentraciones del estándar de referencia (de 0.015 a 8 ng por tubo) y la dilución de las muestras fue realizada en PBS con 1% de albúmina de huevo (*buffer* EA). La separación se logró por segundo anticuerpo, usando antisuero de oveja contra γ globulina de conejo, en diluciones de trabajo establecidas previamente (dilución inicial 1:50).

Los resultados fueron expresados en términos de los estándares de LH de rata RP₃. La sensibilidad del ensayo fue de 0.2 ng/ml y los coeficientes de variación intra e inter-ensayos fueron de 7.2% y 11.4% respectivamente.

El protocolo de rutina fue el siguiente: se agregaron el primer anticuerpo y la hormona trazadora (aproximadamente 15.000 cpm por tubo) a la curva patrón y a las alícuotas experimentales preparadas en *buffer* EA; luego de una incubación de 24 horas a temperatura ambiente se agregó el segundo anticuerpo. El ensayo fue incubado entre 24 a 48 horas a 4°C y posteriormente se separó la hormona libre de la unida, por centrifugación refrigerada (4 °C, Beckmman Instruments) a 2200 rpm, durante 30 min. El sobrenadante fue aspirado y se leyó la radioactividad presente en el precipitado,

correspondiente al complejo hormona-anticuerpo, en un contador gamma Hewlett Packard.

Hormona Folículo Estimulante (FSH):

Para marcar con $^{125}\text{I}_2$ se utilizaron 2.5 μg de la hormona FSH trazadora (NIDDK-rFSH-I-9). El método de marcación fue semejante al descrito para LH.

El protocolo utilizado para la medición fue similar al empleado para LH. El primer antisuero contra FSH de rata (NIDDK-Anti Rat FSH Serum-11) fue obtenido al inmunizar conejos con FSH de rata altamente purificada semejante a la NIDDK-rFSH-I-9. Se diluyó a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo, siendo la dilución inicial de 1:30.000 y la dilución final de 1: 150.000. El estándar de referencia fue FSH purificado de rata (NIDDK-Rat-FSH-RP2), con una contaminación casi nula de LH y TSH. La curva patrón se extiende de 0.1175 a 15ng por tubo. Los resultados fueron expresados en términos de los estándares de FSH de rata RP₃. La sensibilidad del ensayo fue 1.57 ng/ml. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayos para fueron de 8.0% y 13.2% respectivamente.

Radioinmunoanálisis para Hormonas Esteroideas

Testosterona

La Testosterona (T) sérica fue determinada por RIA para hormonas esteroideas (Libertun, 1980).

Preparación de la muestra: 100-.200 μl de suero fueron extraídos dos veces con 2 ml de éter etílico por vez, en tubos de extracción. El extracto se evaporó en un baño a 50°C y el residuo se disolvió, posteriormente, en 500 μl de *buffer* fosfato 0.0.75 M, pH 7.5, conteniendo 0.1% (P/V) de gelatina (*buffer* fosfato gelatina-T). Las muestras

permanecieron luego 24 horas a 4°C para la disolución de la testosterona en el *buffer*. Para el RIA se tomaron 2 alícuotas de 200 µl de cada extracto de muestra de suero.

Estándares: se prepararon a partir de una solución madre de testosterona (Sigma Aldrich, St. Louis MO) de 1 mg/ml en etanol, en un rango de 12.5 a 800 pg por tubo en 200 µl de *buffer* fosfato gelatina-T.

Antisuero: a los tubos conteniendo la curva y las muestras, se agregaron 100 µl de antisuero específico anti testosterona, generosamente provisto por el Dr. G. D. Niswender, (Koreman et al., 1974) disuelto en *buffer* fosfato 0.075 M con gelatina en una dilución de 1:5.000.

Hormona radioactiva: todos los tubos del ensayo recibieron la ³[H]-testosterona (adquirida de New England Nuclear), de una actividad específica de aproximadamente 100 Ci/mmol y una pureza radioquímica del 99%, disuelto en *buffer* fosfato gelatina-T (aproximadamente 10.000 cpm/100 µl).

Las muestras y la curva con el trazador y el anticuerpo se incubaron 24 horas a 4°C.

Separación de la hormona libre del complejo hormona-anticuerpo: la separación se logró por el agregado de una suspensión de Carbón (0.5%)- Dextrano (0.05%) en *buffer* fosfato 0.075 M sin gelatina, recientemente preparada. Esta suspensión adsorbe la hormona libre. Se agregaron 200 µl, se agitó con *vortex* y se incubó 10 min. a 4°C. Luego se centrifugó 10 min. a 3000 rpm. Finalmente, se tomaron 400 µl del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 2 ml de líquido centelleante. Se leyeron los viales en un contador de centelleo líquido. En cuanto a la sensibilidad del ensayo: la concentración más baja detectable cuando se extrajeron 150 µl de suero fue 208.3 pg/ml. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayos fueron de 7.8% y 12.3% respectivamente

Preparación del ARN total y análisis de RT-PCR

Obtención del ARN

El ARN total de pituitarias frescas de rata fue preparado por el método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) que utiliza el reactivo de aislamiento Trizol (Invitrogen, CA, USA), seguido por extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol en presencia de 2.5 M acetato de amonio. En el segundo diseño experimental, las ratas hembras de 8 días tratadas con 1 µg TP en los días 1-4 y las hembras tratadas *in útero* con Flut no fueron incluidas, ya que estos tratamientos no modificaron la expresión del RGABA_{B1} evaluado por Western Blots o los niveles hormonales (ver resultados). La concentración del ARN purificado fue determinada por espectrofotometría (absorbancia 260 nm) y su pureza fue evaluada por la relación de las absorbancias a 260 nm/280 nm (>1.8). La integridad del ARN purificado fue determinada corriendo muestras elegidas al azar en geles desnaturalizantes de formaldehído al 1.2%. Los ARNs fueron mantenidos congelados a -70°C hasta ser analizados.

Retrotranscripción de los ARNs

El ARN total (0.5 µg) proveniente de las pituitarias de los distintos grupos de tratamientos fue retro transcrito a ADNc con 200 unidades de la transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen) y usando 0.05 µg/µl de primers oligo(dT)₁₅ (Biodynamics SRL, Argentina), según las instrucciones del fabricante (4 unidades del inhibidor de ARNasa, 10mMDTT, 0.5 mM de una mezcla de los 4 dNTPs), en un volumen final de 10 µl. La reacción fue incubada a 42°C por 53 min y finalmente la enzima MMLV fue inactivada a 70°C por 15 min. En todas las reacciones de transcripción reversa (RT) se incluyó un control negativo, carente de MMLV.

Amplificación de los ADNc por reacción en cadena de la polimerasa para RGABA_{B1} y β actina

Para la amplificación de los ADNcs de RGABA_{B1} y β -actina se emplearon alícuotas de 2 μ l de la reacción de RT en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se incluyó un control negativo de reacción carente de templado en cada experimento para determinar la exactitud de las PCRs. La PCR fue realizada en un termociclador de la siguiente manera: primero se llevó a cabo una incubación inicial de 5 min a 95 °C (hot start), luego 10 μ l de una mezcla de reacción conteniendo la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen-Life Technologies, USA) fue agregada a cada tubo y finalmente se realizó la amplificación de PCR por 36 (RGABA_{B1}) o 20 ciclos (β -actina) de desnaturalización a 94 °C por 1 min, apareamiento a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min; con una extensión final de 10 min a 72°C luego del último ciclo. Las amplificaciones de PCR se realizaron usando primers de oligonucleótidos específicos, los cuales fueron elegidos para que comprendieran uniones exón-intrón a fin de visualizar una posible contaminación con ADN genómico. Los primers para detectar el ADNc de GABA_{B1} (Bio Synthesis, USA) no distinguen entre las variantes de *splicing* GABA_{B(1a)} y GABA_{B(1b)} y fueron sintetizados basándonos en las secuencias descriptas por Schuler y col. (Schuler et al., 2001), amplificando un fragmento teórico de 254 bp a partir del ARNm y de 690 bp a partir de ADN genómico. Los cebadores para β -actina (Invitrogen-Life Technologies, USA) fueron sintetizados siguiendo secuencias publicadas (Brussaard et al., 1999): *forward*: 5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3'; *reverse*: 5'-GGAAGGTGGACAGTGAGG-3', amplificando un fragmento teórico de 440 bp a partir del ARNm y de 652 bp a partir del ADN genómico. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen de 25 μ l en la presencia de 1U de la Taq

DNA polimerasa, 3 mM MgCl₂, 0.24 mM de una mezcla de los 4 dNTPs y 0.5 μM de los cebadores específicos para RGABA_{B1}. Para β-actina, las condiciones fueron similares, usándose 1U de la Taq ADN polimerasa, 1.5 mM MgCl₂, 0.96 mM dNTPs y 0.5 μM de los cebadores. Finalmente, alícuotas de las reacciones de PCR fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y teñidas con bromuro de etidio. Los geles fueron expuestos a luz UV con un transiluminador blanco/ UV ultravioleta (UVP Lab. Products) y las imágenes cuantificadas con el programa Scion Images del NIH.

Para evaluar los niveles de expresión de los ARNm de RGABA_{B1} de las pituitarias de los diferentes grupos de tratamientos, las PCRs se realizaron usando la expresión del ARNm de β-actina como control de la variación en la concentración de ARN en la reacción de RT. A fin de validar el ensayo para las mediciones de RGABA_{B1}, diferentes cantidades del ARN total fueron retrotranscritas y alícuotas fueron amplificadas con los cebadores específicos para los ARNm de RGABA_{B1} o β-actina por distinto número de ciclos. Una relación linear entre los μg de ARN y los productos de PCR fue obtenida (Figura II.1A).

En consecuencia, 0.5 μg del ARN total fue usado en las reacciones de RT. Una relación linear entre los productos de PCR y el número de ciclos también fue obtenida cuando se usaron 0.5 μg de ARN total en la RT (Figura II.1B). A partir de estas curvas se seleccionaron 36 y 20 ciclos de amplificación de PCR para RGABA_{B1} y β-actina, respectivamente. Finalmente, una relación linear en la detección también fue lograda cuando diferentes cantidades de ADNc, obtenidas por retro-transcripción de 0.5 μg de ARN, fueron sometidas a PCR (Figura II.1C).

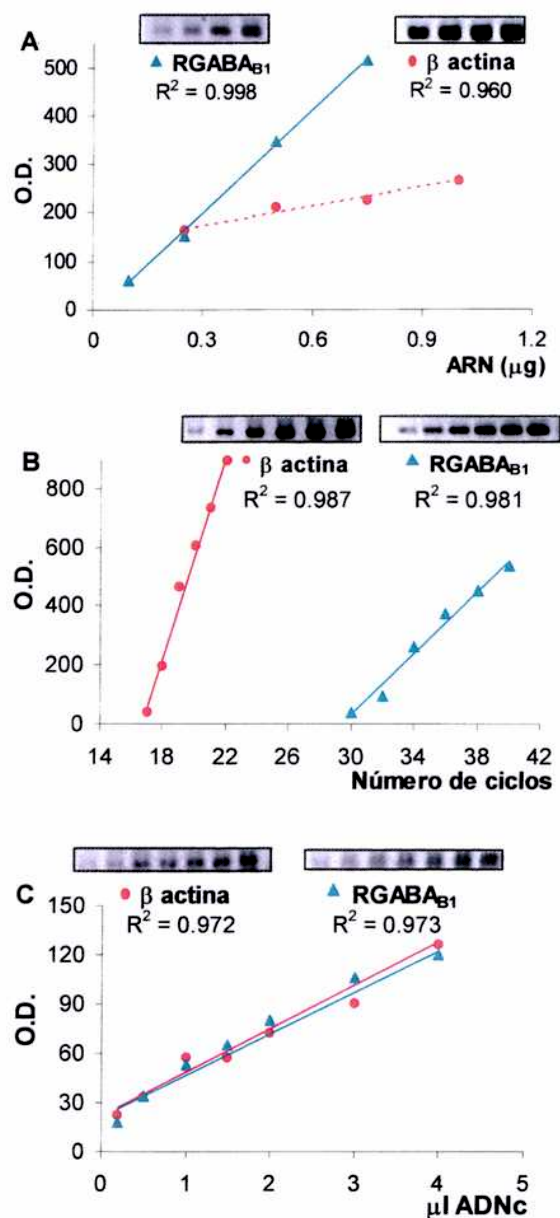


Figura II.1: Validación de la RT-PCR semicuantitativa para la subunidad RGABA_{B1} y β actina.

ARN total de pituitarias fue retro-transcripto. Una relación lineal fue observada entre la densidad óptica de los productos de PCR y: A) μ g de ARN; B) número de ciclos cuando 0.5 μ g de ARN fueron retro-transcriptos y C) μ l de ADNc cuando 0.5 μ g de ARN fueron retro-transcriptos y amplificados por 36 y 20 ciclos para la subunidad RGABA_{B1} y β actina respectivamente. Una curva representativa se muestra para cada caso.

Drogas

Propionato de testosterona y Flutamida (2-metil-N-[4-nitro-3-(trifluorometil)-fenil]propanamida), un antagonista del receptor de andrógenos, fueron adquiridos de Sigma Aldrich, St. Louis, MO.

Análisis estadísticos

Las diferencias en la expresión de las subunidades del RGABA_B, los niveles hormonales, los niveles del ARNm de RGABA_{B1}, los niveles de los neurotransmisores y los parámetros puberales fueron analizados por análisis de varianzas de uno o dos sentidos (ANOVA) seguidos por el *test a posteriori* de Tukey HSD para N desiguales (Statistica v 5). Los datos fueron transformados cuando el *test* para homogeneidad de varianzas y/o de normalidad así lo requerían. En el caso de las mediciones de LH en animales de 8 días, ninguna transformación de los datos permitió el cumplimiento de los *tests* de homogeneidad de varianzas, por lo que los datos fueron analizados por el *test* de ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis. Las correlaciones fueron analizadas con Statistica v 5. En todos los casos los resultados fueron considerados significativos cuando $p < 0.05$.

Resultados

Efectos de la androgenización neonatal de las hembras y de la castración en machos sobre la expresión de $RGABA_{B1}$ y los niveles hormonales.

En concordancia con nuestros resultados previos, las proteínas de ambas variantes de splicing de la subunidad $RGABA_{B1}$ del receptor, $RGABA_{B(1a)}$ y $RGABA_{B(1b)}$, se expresaban en la glándula adenohipofisaria de hembras y machos de animales de 8 y 15 días (Figura II.2), siendo la primera significativamente más abundante en todos los grupos y siguiendo ambas variantes patrones de expresión paralelos entre los grupos experimentales. Además, la expresión de las subunidades $RGABA_{B1}$ fue máxima en las membranas adenohipofisarias de las hembras de 8 días (8H), confirmando que su expresión disminuye con la edad y que es mayor en hembras que en machos a edades tempranas del desarrollo (8M). No se observaron diferencias entre los sexos en los animales controles de 15 días (15H y 15M). La androgenización neonatal (tratamiento con 100 μ g TP: 8H100TP) disminuyó significativamente la expresión de la subunidad $RGABA_{B1}$ en las membranas adenohipofisarias de ratas hembras de 8 días alcanzando niveles similares a los observados en los machos controles. Por otro lado, la castración neonatal en los machos (8MC) no alteró significativamente la expresión de $RGABA_{B1}$. Para determinar si estos tratamientos también afectaban la expresión del ARNm de la subunidad $RGABA_{B1}$, se llevaron a cabo RT-PCR semi-cuantitativas a partir de pituitarias de animales pertenecientes a estos mismos grupos, obteniéndose resultados similares (Figura II.3).

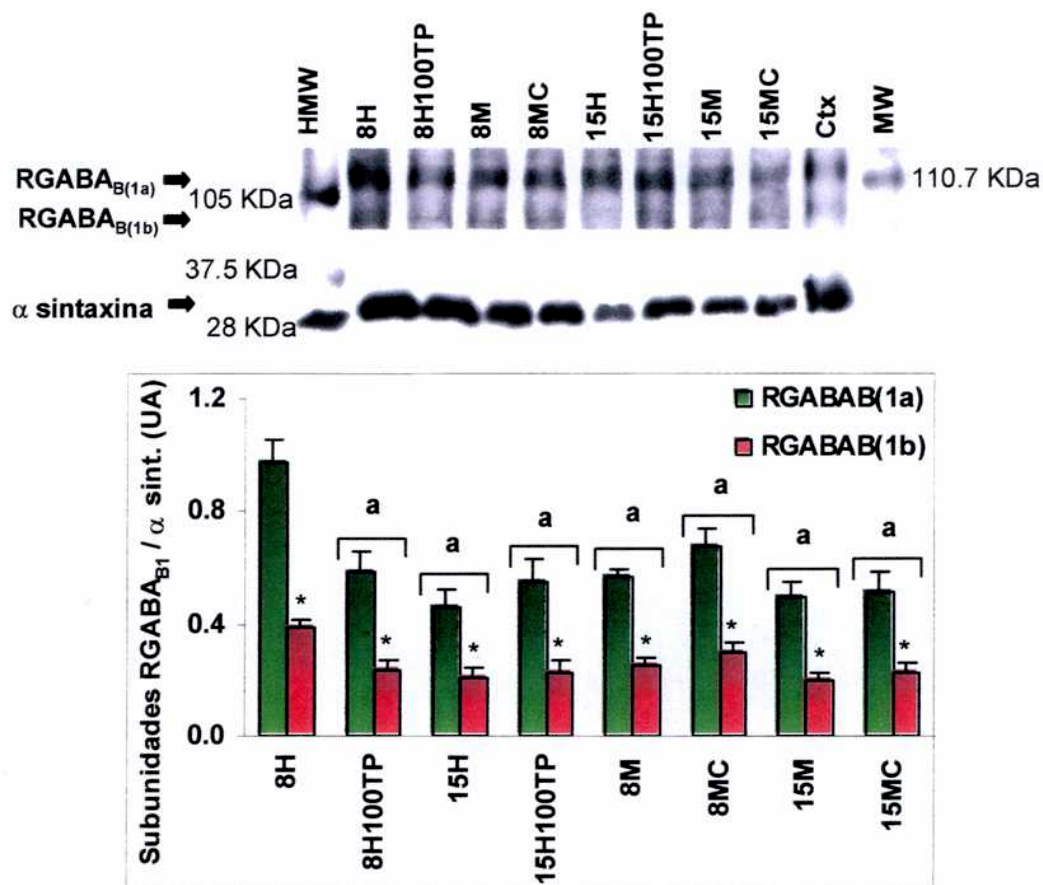


Figura II.2: Expresión de la subunidad RGABA_{B1} en hipófisis anterior de ratas de 8 y 15 días bajo diferentes tratamientos determinados por Western blots.

Para ésta y las siguientes figuras: 8H y 15H: hembras controles de 8 y 15 días (inyectadas con aceite de ricino), 8H100TP y 15H100TP: hembras de 8 y 15 días tratadas con 100 μ g de TP en el día de nacimiento, 8M y 15M: machos controles con castración ficticia y 8MC y 15MC: machos de 8 y 15 días castrados en el día de nacimiento.

Panel superior: Western Blot representativo para la expresión de las subunidades RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)} y α syntaxina. Ctx: membranas de corteza usadas como controles positivos. HMW y MW: marcadores de peso molecular. UA: unidades arbitrarias.

Panel inferior: Los datos fueron expresados como la relación de la expresión de la subunidad RGABA_{B1} respecto de la expresión de α syntaxina. Número de muestras por grupo: 8H=10, 8H100TP=7, 15H=6, 15H100TP=5, 8M=11, 8MC=11, 15M=5, 15MC=5. Los resultados fueron analizados por un ANOVA en dos sentidos: interacción: ns, indicando que ambas subunidades siguen el mismo patrón de expresión entre los grupos, factor subunidad: $p < 0.001$, indicando que los niveles de RGABA_{B(1a)} son mayores que los de RGABA_{B(1b)}, factor tratamiento: $p < 0.02$ o menor, a: diferente de hembras controles (8H); *: diferente de los niveles de RGABA_{B(1a)}.

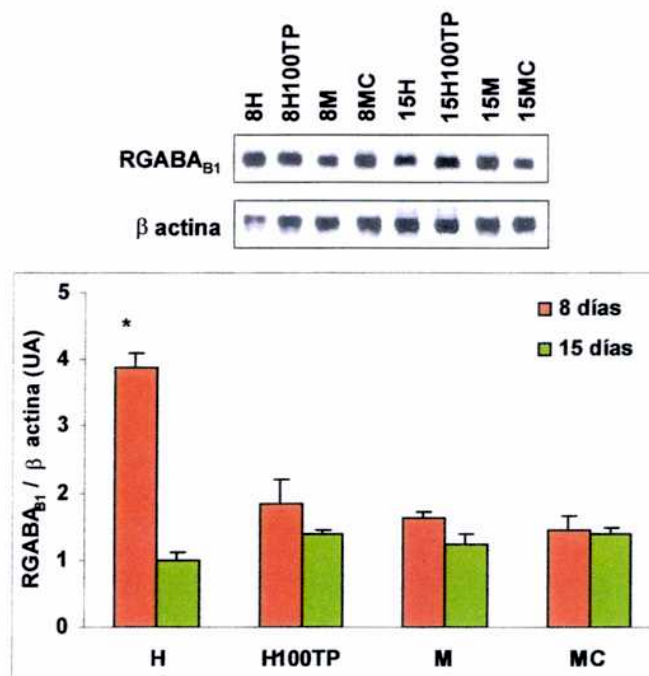


Figura II.3: Expresión del ARNm de la subunidad RGABA_{B1} en la hipófisis anterior de ratas de 8 y 15 días bajo diferentes tratamientos, determinado por RT-PCR semicuantitativa.

Panel superior: Gel representativo de una RT-PCR para la expresión de la subunidad RGABA_{B1} y de β actina.

Panel inferior: Los datos fueron expresados como la relación de la expresión de la subunidad RGABA_{B1} respecto de la expresión de β actina. Los resultados fueron analizados por un ANOVA en dos sentidos tomando como factores la edad y los tratamientos, interacción: $p < 0.001$, *: $p < 0.001$ diferente de todos los otros grupos. Número de casos por grupo: 8H=5, 8H100TP=5, 15H=6, 15H100TP=5, 8M=4, 8MC=5, 15M=6, 15MC=4.

Los tratamientos neonatales produjeron alteraciones en los títulos de gonadotrofinas, lo cual confirmó sus eficacias. De esta manera, el tratamiento neonatal con testosterona redujo en las hembras la LH sérica (Figura II.4) ya sea a niveles de macho control de 8 días [LH (ng/ml): 8H: 1.13 ± 0.09 vs. 8H100TP: 0.48 ± 0.06 o 8M: 0.55 ± 0.04 , $p < 0.01$] o aún a niveles menores en las ratas de 15 días [LH (ng/ml): 15H: 1.14 ± 0.16 vs. 15H100TP: 0.28 ± 0.05 vs. 15M: 0.52 ± 0.05 , $p < 0.01$]. Por lo contrario, los machos castrados neonatalmente mostraron un aumento muy significativo en los títulos de LH a ambas edades [LH (ng/ml): 8MC: 2.70 ± 0.29 y 15MC: 17.58 ± 1.24 , $p < 0.01$] siendo aún

mayores que en las hembras controles. Más aún, el aumento en los machos castrados de 15 días fue considerablemente más importante que en los machos castrados de 8 días.

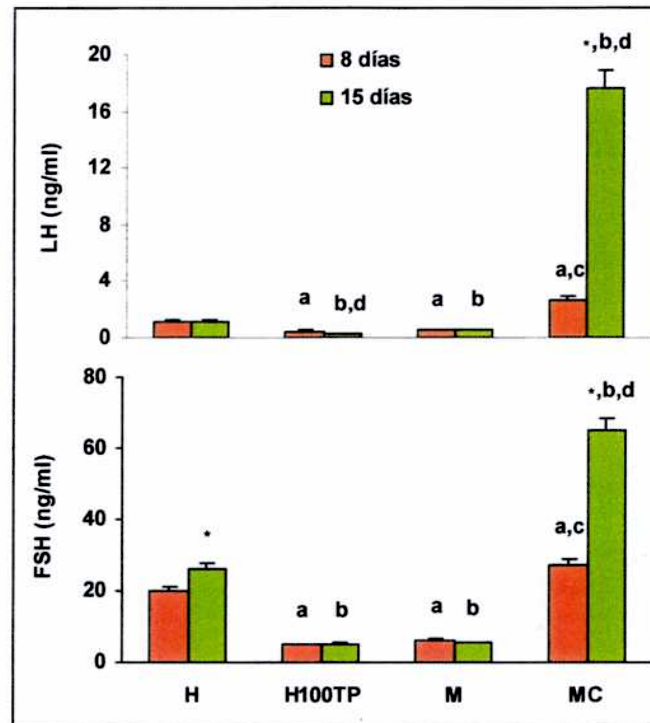


Figura II.4: Niveles séricos de gonadotrofinas en animales de 8 y 15 días bajo diferentes tratamientos.

Panel superior: LH (ng/ml), **panel inferior:** FSH (ng/ml). Los datos (n= 15-20 animales por grupo) fueron analizados por un ANOVA en dos sentidos tomando como factores la edad y los tratamientos, interacción: $p < 0.001$, a: diferente de hembras controles de 8 días, b: diferente de hembras controles de 15 días, c: diferente de machos controles de 8 días, d: diferente de machos controles de 15 días, *: diferente de los animales de 8 días dentro del mismo grupo.

Con respecto a los niveles de FSH séricos (Figura II.4), se obtuvieron resultados similares: la androgenización redujo significativamente los títulos de FSH en las hembras de 8 y 15 días alcanzando niveles de machos [FSH (ng/ml): 8H100TP: 4.96 ± 0.22 vs. 8H: 19.87 ± 1.06 y 15H100TP: 5.05 ± 0.31 vs. 15H: 25.93 ± 1.65 , $p < 0.01$] mientras que la castración promovió un importante aumento en FSH.

Cuando se analizaron los niveles de testosterona (Figura II.5) en los diferentes grupos de animales pudimos observar, como esperábamos, que los machos tenían más

testosterona que las hembras [T (pg/ml): 8M: 402.3±39.8 vs 8H: 267.3±17.6, $p<0.01$]. No se observaron diferencias entre las edades dentro de cada grupo. Además, los machos castrados neonatalmente presentaron niveles de esta hormona semejantes a las hembras [T (pg/ml): 8MC: 267.7±21.9], mientras que las hembras androgenizadas presentaron niveles de machos [T (pg/ml): 8H100TP: 540.1±72.2], exhibiendo así una testosterona elevada aún 14 días después de la administración del TP.

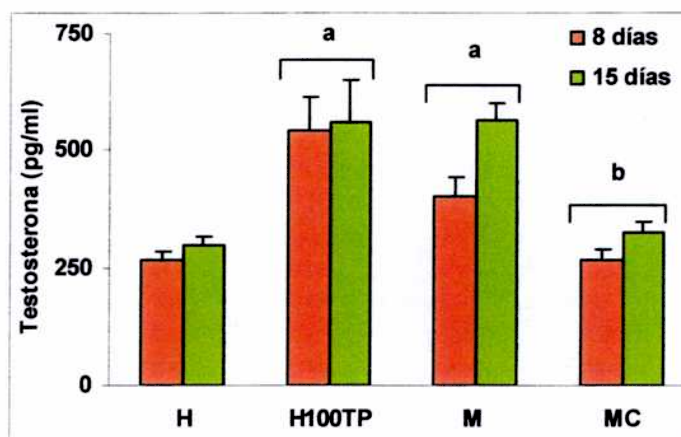


Figura II.5: Niveles de testosterona sérica en animales de 8 y 15 días bajo diferentes tratamientos.

Los datos ($n=15-20$ animales por grupo) fueron analizados por ANOVA tomando como factores la edad y los tratamientos, interacción: ns, factor edad: $p<0.001$, factor tratamientos: $p<0.001$ o menor, a: diferente de hembras controles, b: diferente de machos controles.

Efectos del tratamiento *in utero* con Flutamida en los machos y de la administración de bajas dosis de testosterona en las hembras sobre la diferenciación sexual de la expresión de la subunidad del receptor $GABA_{B1}$ y sobre los niveles hormonales

Como no se observaron diferencias en la expresión de las subunidades del $RGABA_{B1}$ en las membranas adenohipofisarias de los animales de 15 días, en los experimentos posteriores sólo se usaron animales de 8 días.

Aunque el tratamiento de las hembras con 100 µg TP en el día de nacimiento indujo una disminución en la expresión adenohipofisaria de las subunidades RGABA_{B1} a niveles de machos al día 8 de vida, no podíamos discriminar si esto se debía a un efecto organizacional del esteroide, es decir, un efecto sobre la diferenciación sexual o a un efecto de activación de la testosterona dado que sus niveles séricos estaban aún elevados al momento del sacrificio. Por otra parte, el hecho que no se observara un aumento en la expresión de las subunidades RGABA_{B1} en los machos de 8 días castrados neonatalmente, podría haberse debido a una defemenización incompleta del SNC, como resultado del *imprinting* intrauterino de testosterona en el día 18 de gestación.

Por estas razones, se llevo a cabo un nuevo conjunto de experimentos. A fin de distinguir entre un efecto masculinizante y un efecto hormonal de la testosterona, hembras recién nacidas fueron sometidas a un protocolo de androgenización con dosis mucho más bajas (1 µg TP sc durante 4 días consecutivos, comenzando en el día de nacimiento). Además, para suprimir el *imprinting* intrauterino de testosterona, ratas con fecha de preñez conocida fueron inyectadas con Flutamida (Flut) desde el día 17 de gestación hasta el día previo al alumbramiento.

Nuevamente, en todos estos grupos experimentales ambas variantes de splicing de RGABA_{B1} se expresaron de manera paralela, siendo RGABA_{B(1a)} siempre más abundante que RGABA_{B(1b)}. El nuevo modelo de androgenización, con dosis menores de TP, no modificó la expresión de la subunidad RGABA_{B1}, siendo su nivel similar al de las hembras 8 días y significativamente mayor que los machos 8 días ($p < 0.05$) (Figura II.6).

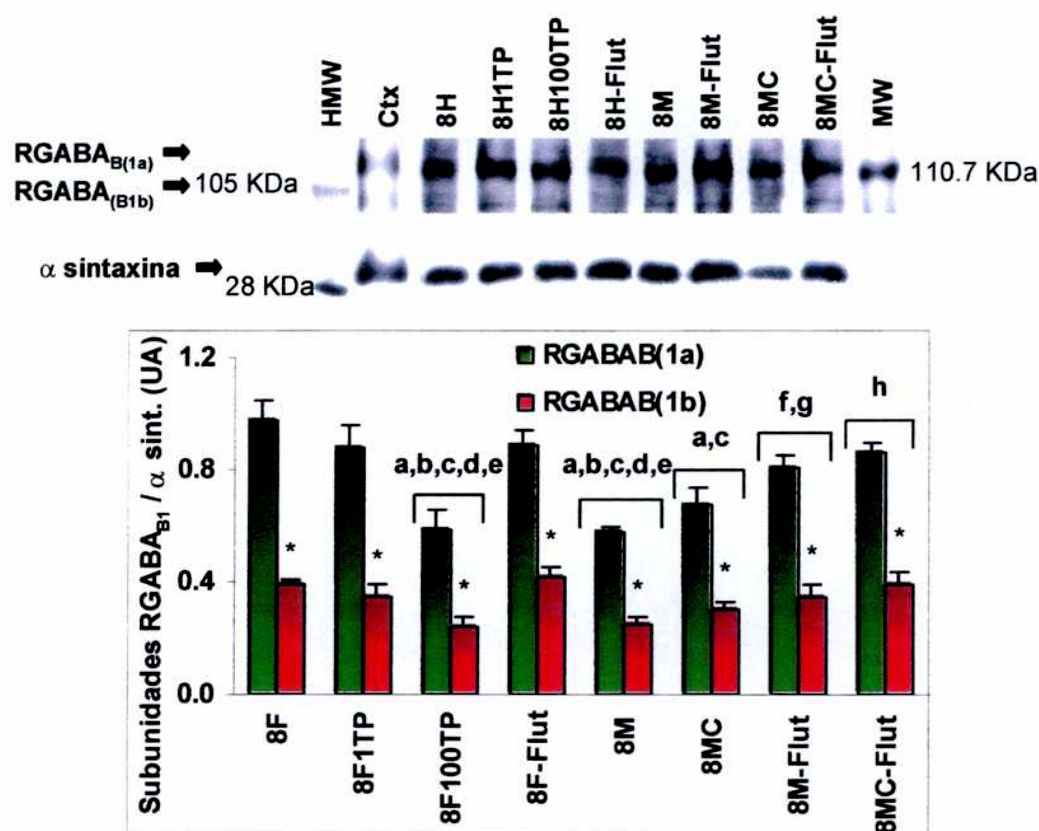


Figura II. 6: Expresión de las subunidades RGABA_{B1} en la hipófisis anterior de animales de 8 días bajo diferentes tratamientos determinada por *Western blots*. Para ésta y las siguientes figuras: 8H: hembras controles de 8 días, 8H1TP: hembras de 8 días inyectadas con 1 μ g de TP en los días 1-4 de vida, 8H100TP: hembras de 8 días tratadas con 100 μ g de TP en el día de nacimiento, 8H-Flut: crías hembras de 8 días de madres inyectadas con Flutamida, 8M: machos controles de 8 días, 8MC: machos de 8 días castrados en el día del nacimiento, 8M-Flut: machos de 8 días de madres inyectadas con Flutamida, 8MC-Flut: machos de 8 días de madres inyectadas con Flutamida y castrados en el día del nacimiento. **Panel superior:** *Western Blot* representativo para la expresión de las subunidades RGABA_{B(1a)} y RGABA_{B(1b)} y α syntaxina..

Panel inferior: Los datos fueron expresados como la relación de la expresión de la subunidad RGABA_{B1} respecto de la expresión de α syntaxina. Número de muestras por grupo: 8H=12, 8H1TP=6, 8H100TP=12, 8H-Flut=6, 8M=12, 8MC=12, 8M-Flut=6 y 8MC-Flut=10. Los resultados fueron analizados por un ANOVA en dos sentidos: interacción: ns, indicando que ambas variantes de splicing siguen el mismo patrón de expresión en los grupos, factor subunidad: $p < 0.001$, indicando que RGABA_{B(1a)} es siempre mayor que RGABA_{B(1b)}, factor tratamiento: $p < 0.001$, a: diferente de 8H, b: diferente de 8H1TP, c: diferente de 8H-Flut, d: diferente de 8M-Flut, e: diferente de 8MC-Flut, f: diferente de 8H100TP, g: diferente de 8M, h: diferente de 8MC.

En las membranas adenohipofisarias de machos de 8 días expuestos *in utero* a Flut, se pudo observar un aumento significativo en los niveles de la subunidad RGABA_{B1}

(8M-Flut vs. 8M, $p<0.05$). Además, los machos en los cuales la T no ejerció su acción durante ninguno de los periodos de la diferenciación sexual (MC-Flut), presentaron nuevamente una expresión de la subunidad $RGABA_{B1}$ mayor que 8M, pero ellos también mostraron niveles estadísticamente más altos que 8MC (8MC-Flut vs. 8MC, $p<0.05$). Por otra parte, el tratamiento prenatal con Flut no alteró la expresión de estas variantes del receptor en las hembras de 8 días. Estos resultados se confirmaron a nivel de ARNm mediante RT-PCR (Figura II.7).

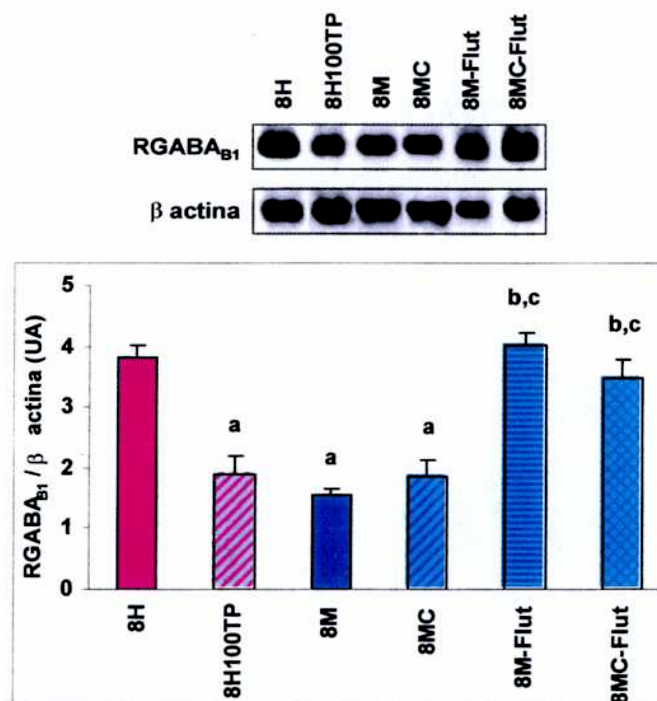


Figura II.7: Expresión del ARNm de la subunidad $RGABA_{B1}$ en la hipófisis anterior de animales de 8 días bajo diferentes tratamientos determinada por RT-PCR semicuantitativa.

Panel superior: Gel representativo de una RT-PCR para la expresión de la subunidad $RGABA_{B1}$ y de β actina.

Panel inferior: Los datos fueron expresados como la relación de la expresión de la subunidad $RGABA_{B1}$ respecto de la expresión de β actina. Los resultados fueron analizados por un ANOVA en un sentido. *: $p<0.001$, a: diferente de 8H, b: diferente de 8M, c: diferente de 8MC. Número de casos por grupo: 8H=5, 8H100TP=5, 8M=4, 8MC=5, 8M-Flut=4 y 8MC-Flut=4.

A fin de corroborar la efectividad de los tratamientos, analizamos los niveles séricos de las gonadotropinas en los diferentes grupos de animales. La androgenización suave (8H1TP) no indujo ninguna alteración en los títulos de FSH y de LH (Figura II.8) [LH (ng/ml): 8H: 2.00 ± 0.18 vs. 8H1TP: 2.59 ± 0.24 , ns].

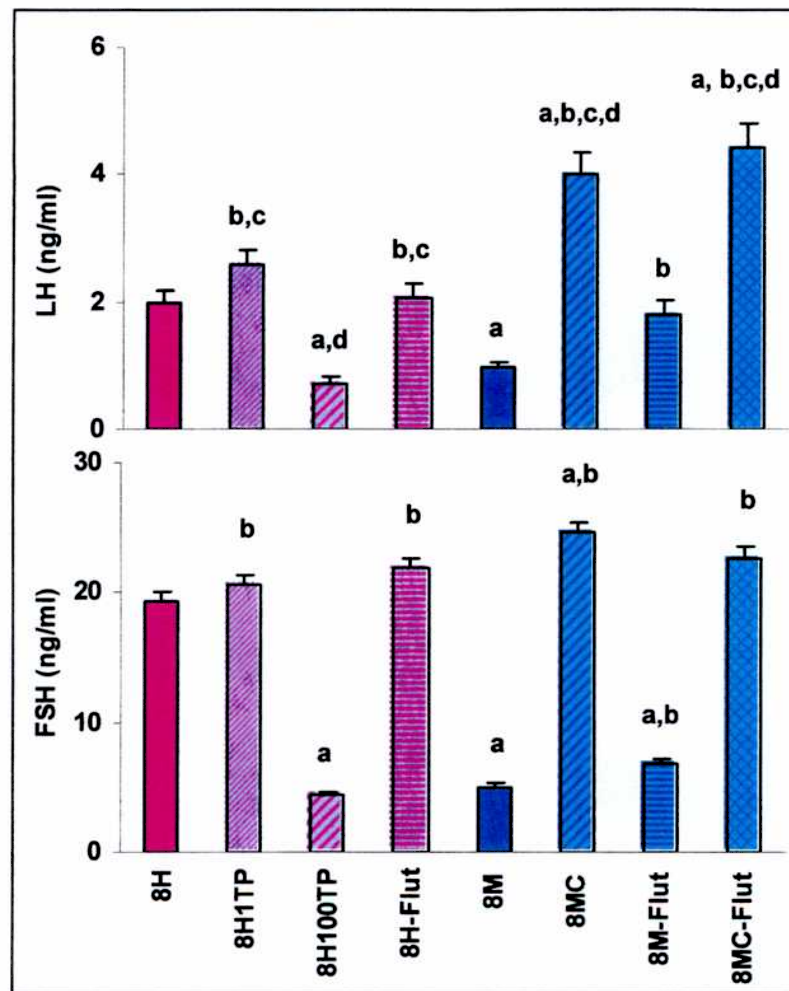


Figura II.8: Niveles séricos de gonadotropinas en animales de 8 días bajo diferentes tratamientos.

Panel superior: LH (ng/ml), **panel inferior:** FSH (ng/ml). Los datos de LH fueron analizados por un *test* de ANOVA no paramétrico, $p < 0.001$. a: diferente de 8H, b: diferente de 8H100TP, c: diferente de 8M, d: diferente de 8M-Flut. Los datos de FSH fueron analizados por un ANOVA en un sentido, $p < 0.001$, a: diferente de 8H, b: diferente de 8M. $n = 15-20$ animales por grupo.

En el grupo de machos tratados con Flut (8M-Flut), no hubo diferencias significativas en los títulos de LH con respecto a 8M y 8H; sin embargo, los títulos de FSH en este grupo fueron significativamente diferentes a ambos sexos, siendo significativamente mayores que en 8M y significativamente menores que en 8H (8M-Flut vs 8M y 8M-Flut vs 8H, $p<0.01$). Los machos castrados neonatalmente y tratados con Flut (8MC-Flut) presentaron patrones de gonadotrofinas similares a los machos castrados (8MC) [LH (ng/ml): 8MC-Flut: 4.44 ± 0.35 vs 8MC: 4.01 ± 0.35 , ns]. Por otra parte, el tratamiento con Flut no modificó las gonadotropinas séricas en hembras de 8 días.

Cuando se analizó la testosterona sérica en estos animales (Figura II.9), observamos que las hembras sometidas a la androgenización con dosis bajas de testosterona, todavía presentaban títulos elevados de esta hormona a los 8 días de vida, no difiriendo de los hallados en 8H100TP y 8M [T (pg/ml): 8H1TP: 520.5 ± 90.9 vs 8H100TP: 647.1 ± 144.2 vs 8M: 453.1 ± 48.8 , ns].

Con respecto a los animales tratados prenatalmente con Flut (8M-Flut), éstos mostraron niveles de testosterona de machos controles y los 8MC-Flut tuvieron títulos similares a los de machos castrados [T (ng/ml): 8M-Flut: 415.0 ± 37.8 vs 8MC-Flut: 256.8 ± 19.7 vs 8MC: 243.3 ± 15.6 , $p<0.01$]. El tratamiento con Flut no alteró los niveles de esta hormona en las hembras.

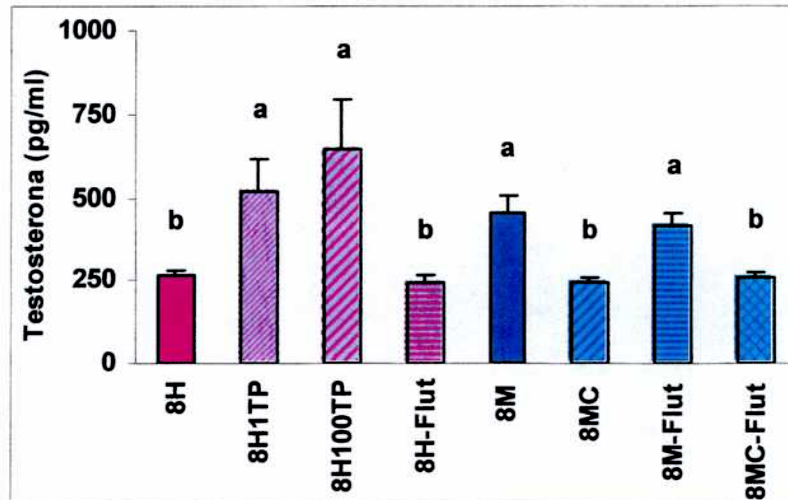


Figura II.9: Niveles de testosterona sérica en animales de 8 días bajo diferentes tratamientos.

Los datos (n= 15-20 animales por grupo) fueron analizados por ANOVA en un sentido, $p < 0.001$, a: diferente de 8H, b: diferente de 8M.

Efectos de la manipulación perinatal de las hormonas sexuales sobre los niveles de neurotransmisores aminoacídicos: correlación con la expresión adenohipofisaria de los RGABA_B.

Se ha demostrado que GABA modula la expresión de sus receptores en el SNC (Schousboe, 1999). Por lo tanto, evaluamos en los mismos grupos de animales de 8 días descritos en el segundo diseño experimental los niveles de GABA y glutamato (su precursor biosintético) en el hipotálamo y en la corteza, elegida como un área control. Además, se evaluaron los neurotransmisores taurina y aspartato para determinar la especificidad de los efectos.

En la corteza no se observaron diferencias en taurina, aspartato, glutamato o GABA entre ninguno de los grupos experimentales (8H, 8H1TP, 8H100TP, 8H-Flut, 8M, 8MC, 8M-Flut y 8MC-Flut) (Figura II.10).

Por el contrario, los niveles de glutamato en el hipotálamo fueron significativamente menores en todos los grupos de machos, independientemente de los tratamientos, que en las hembras controles (Figura II.11). De manera sorprendente, las hembras tratadas con Flut mostraron niveles bajos de glutamato ($p < 0.05$ con respecto a las hembras controles), similares a los títulos de machos.

Llamativamente, los niveles hipotalámicos de GABA en los diferentes grupos mostraron el mismo patrón que la expresión del $RGABA_B$ adenohipofisario (Figura II.11). Los niveles de GABA en las hembras controles fueron mayores que en los machos controles. En las hembras 100TP, pero no en las 1TP, los mismos disminuyeron a niveles de macho control. Además, la Flut más la castración aumentaron el GABA de los machos a niveles de hembras controles.

Hubo una correlación significativa entre el GABA hipotalámico y la expresión adenohipofisaria del $RGABA_B$ ($r = 0.77$, $p < 0.05$) (Figura II.12). Esta relación fue más precisa cuando sólo los grupos de machos fueron incluidos ($r = 0.97$, $p < 0.02$).

Al analizar sólo las hembras, la correlación no dio significativa; el grupo tratado con Flut aumentó el error, ya que este tratamiento no influenció a ambos parámetros en el mismo sentido. La taurina y el aspartato mostraron niveles similares en los hipotálamos de los diferentes grupos.

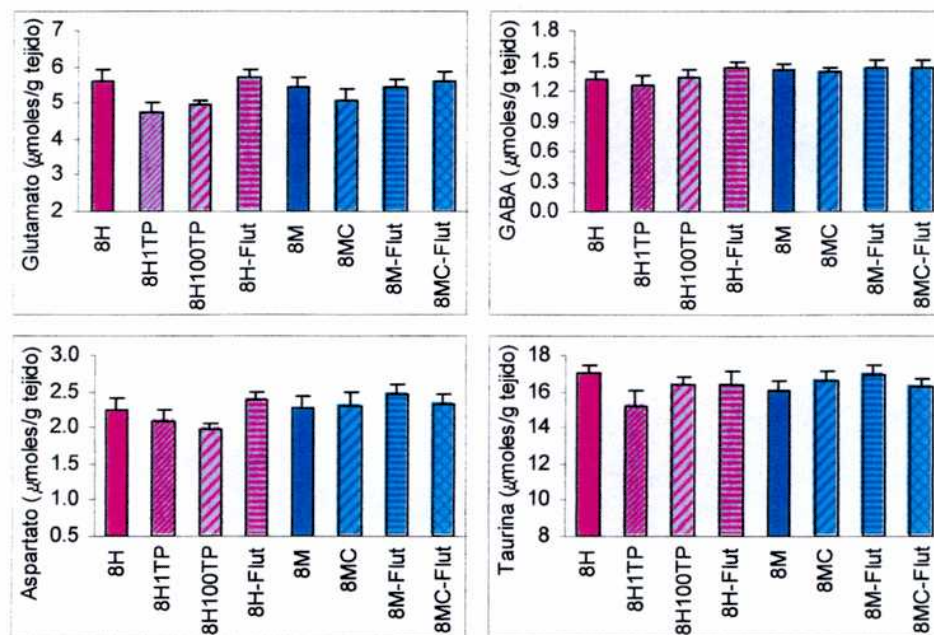


Figura II. 10: Niveles de Glutamato, GABA, Aspartato y Taurina ($\mu\text{moles/g}$ de tejido) en cortezas cerebrales de animales de 8 días bajo diferentes tratamientos.
 Los datos ($n=6-11$ animales por grupo) fueron analizados por ANOVA en un sentido, siendo no significativo para los 4 neurotransmisores analizados.

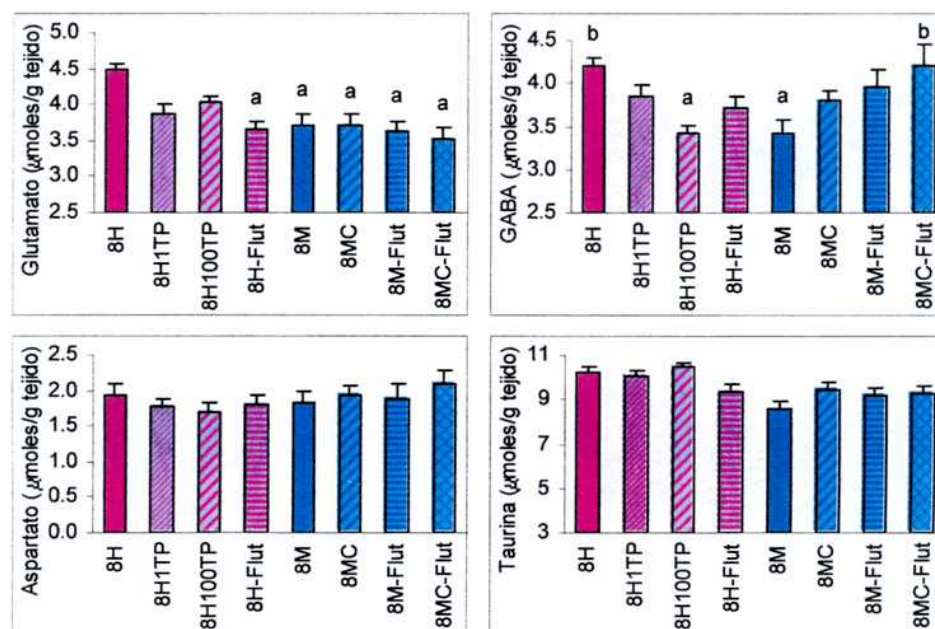


Figura II.11: Niveles de Glutamato, GABA, Aspartato y Taurina ($\mu\text{moles/g}$ de tejido) en hipotálamos de animales de 8 días bajo diferentes tratamientos.
 Los datos ($n=6-11$ animales por grupo) fueron analizados por ANOVA en un sentido: $p<0.01$ para Glutamato y GABA. a: $p<0.05$ o menor vs. 8H; b: $p<0.05$ vs. 8M.

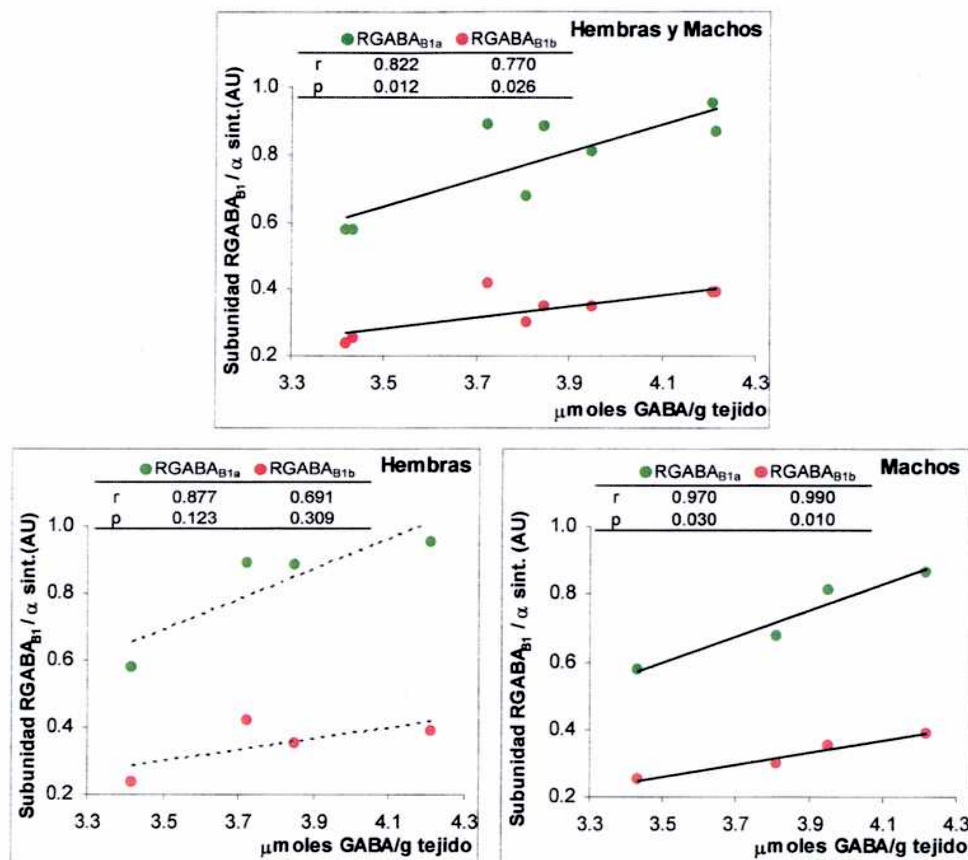


Figura II.12: Correlaciones entre las expresiones de la subunidad RGABA_{B1} en la pituitaria y el contenido de GABA hipotalámico.

Panel superior: correlaciones incluyendo los grupos: 8H, 8H1TP, 8H100TP, 8H-Flut, 8M, 8MC, 8M-Flut y 8MC-Flut (n=8).

Panel inferior izquierdo: correlaciones incluyendo sólo los machos: 8M, 8MC, 8M-Flut y 8MC-Flut (n=4).

Panel inferior derecho: correlaciones incluyendo sólo las hembras: 8H, 8H1TP, 8H100TP, 8H-Flut, (n=4). r: coef. de correlación de Pearson, p: significación estadística de la correlación.

Efectos de los protocolos de androgenización sobre el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal.

Con el propósito de corroborar los efectos de los diferentes tratamientos con testosterona sobre la diferenciación sexual, se permitió que un grupo de ratas hembras alcanzaran la adultez, estudiando diferentes parámetros a lo largo de su desarrollo (Tabla II.1).

Hembras Adultas	Día de AV	PC a la AV (g)	PC en el día 34	CE en la adultez
Control	38 ±1	112.6 ±3.7	94.4 ±1.9	85% regular
1TP	34 ±1*	92.1 ±3.5*	92.1 ±3.5	100% anestro
100TP	NO		98.0 ± 3.0	

Tabla II.1: Parámetros de pubertad y ciclicidad en ratas hembras adultas controles y tratadas con testosterona.

Ratas hembras adultas, pertenecientes al segundo diseño experimental (Materiales y Métodos) evaluadas en la eclosión puberal y en la adultez. AV: apertura vaginal, PC: peso corporal, CE: ciclos estrales. Hembras adultas 1TP: AV como *pinhole*. ∴ p<0.05 diferente de los controles, a: diferente de los niveles AM, b: FSH (AM y PM) niveles diferentes de 1TP y 100TP.

Primero, se registró la apertura vaginal. En las hembras que habían sido tratadas con 1 µg TP por 4 días consecutivos (H1TP), la apertura vaginal ocurrió en los días 34 ± 1 de edad, lo cual fue significativamente más temprano que en las hembras controles (p<0.05). Esta diferencia no se debió a diferencias en el peso corporal a esta edad. Por el contrario, las hembras que habían recibido una única inyección de 100 µg TP en el día de nacimiento (H100TP) no mostraron apertura vaginal hasta los 75 días de vida (cuando el experimento fue finalizado). Luego se determinaron los ciclos estrales luego de la apertura vaginal. Mientras que el 85% de las hembras controles (H) mostraron ciclos regulares, ninguna de las H1TP cicló (100% anestros).

Finalmente se analizaron las gonadotrofinas séricas de estos animales. Como esperábamos, las hembras controles presentaron un aumento significativo en los niveles de LH en la tarde del proestro mientras que en las H1TP y H100TP no se observaron diferencias en los títulos de LH entre la mañana y la tarde. Con respecto a FSH sérica,

H1TP y H100TP tuvieron niveles significativamente más altos que las hembras controles ($p<0.02$) en la adultez.

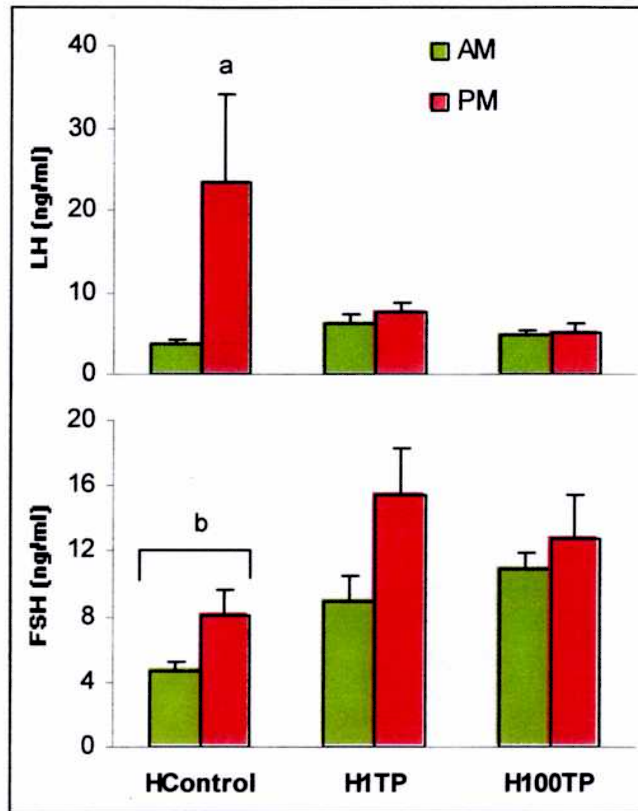


Figura II.13 Niveles de LH (panel superior) y de FSH (panel inferior) a la mañana (AM) y tarde (PM) en ratas hembras pertenecientes al tercer diseño experimental.

Análisis estadístico: LH: ANOVA en dos sentidos. Interacción: $p<0.01$, a: diferente de H1TP y H100TP; FSH: ANOVA en dos sentidos. Interacción: NS; Efecto principal Tiempo (AM vs PM): $p<0.02$; Efecto principal Tratamiento: $p<0.01$, a: diferente de H1TP y H100TP.

Discusión

En el capítulo anterior hemos descripto que los RGABA_B muestran un patrón de expresión claramente dimórfico en la adenohipófisis en etapas tempranas del desarrollo. La expresión de la subunidad RGABA_{B1} disminuye con la edad en ambos sexos, siendo significativamente más abundante en las hembras que en los machos a los 4 y 12 días de edad (Bianchi et al., 2001). Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos estudiar *in vivo* la participación de los esteroides sexuales en la regulación de la expresión de las subunidades del RGABA_B hipofisario, ya que estos esteroides están críticamente involucrados en la diferenciación sexual del cerebro.

En consecuencia, evaluamos la expresión de la subunidad RGABA_{B1} del receptor en las pituitarias de hembras androgenizadas y machos castrados neonatalmente a los 8 y 15 días de edad en comparación con animales controles. En concordancia con nuestros resultados previos, las hembras de 8 días presentaron niveles de expresión mayores que las hembras de 15 días o que los machos de 8 días. A los 15 días de edad la diferencia sexual en los RGABA_B ya no era evidente. Se ha demostrado que las diferencias sexuales pueden manifestarse luego que el período crítico de acción hormonal ha pasado y estos altos niveles hormonales ya no están presentes (Jacobson et al., 1981; Ito et al., 1986; Davis et al., 1996b), como en las diferencias sexuales en la secreción de gonadotrofinas (pico de LH en el proestro presente en hembras y ausente en machos) (Becu-Villalobos et al., 1990; Becu-Villalobos et al., 1997). Contrariamente, varias características que no pueden diferenciarse por sexo en la adultez pueden presentar diferencias sexuales transitorias durante el desarrollo (Levitt and Rakic, 1980; Tobet and Hanna, 1997; De Vries, 2004). Por ejemplo, las ratas machos expresan niveles mucho más altos del receptor de P₄ que las hembras en el área preóptica medial en la

etapa perinatal; esta diferencia sexual comienza a desaparecer una vez que los ovarios se vuelven activos y está ausente en la adultez (Quadros et al., 2002a). La expresión del gen del RGABA_B presenta características similares.

La androgenización neonatal de las hembras redujo la expresión de la subunidad del RGABA_B a niveles de macho, mientras que la castración neonatal de los machos no indujo cambios significativos. Para corroborar la eficacia de los tratamientos se midieron las gonadotrofinas y T séricas, ya que ambos parámetros son sexualmente dimórficos (Dohler and Wuttke, 1975). En efecto, las gonadotrofinas son mayores en las hembras que en los machos a los 8 y 15 días post-nacimiento, siendo FSH también mayor en las hembras de 15 días que en las de 8 días, de acuerdo a lo descrito por otros autores (Dohler and Wuttke, 1975; Becu-Villalobos et al., 1990; Becu-Villalobos et al., 1997). Las hembras tratadas neonatalmente con 100 µg TP mostraron patrones de gonadotrofinas de macho, mientras que los machos castrados neonatalmente mostraron una aumentada secreción de gonadotrofinas, aún mayor que las hembras controles. Esto puede deberse a la falta de retroalimentación negativa de las hormonas gonadales circulantes debido a la castración. Más aún, en los machos orquidectomizados de 15 días de edad los niveles fueron significativamente mayores que en los machos castrados de 8 días. Se ha demostrado que el GnRH hipotalámico aumenta a lo largo del desarrollo alcanzando en los machos los niveles de adultos a la edad de 30 días (Jakubowski et al., 1991). A su vez, los días 8 a 12 del desarrollo postnatal en las hembras, están caracterizados por altos niveles de FSH, picos esporádicos de LH y una alta sensibilidad al GnRH (Dohler and Wuttke, 1974; Dohler and Wuttke, 1975; MacKinnon et al., 1976; Ojeda et al., 1977; Becu-Villalobos et al., 1989; Becu-Villalobos et al., 1990; Ojeda and Urbanski, 1994; Becu-Villalobos et al., 1997; Casto et al., 2003). En contraste, los niveles de LH y FSH como así también la sensibilidad de

la pituitaria al GnRH son bajos en los machos a esta edad (Debeljuk et al., 1972; Casto et al., 2003). Por lo tanto, los altos niveles de gonadotrofinas en los machos castrados de 15 días pueden ser la consecuencia de una combinación de la adquisición de características femeninas más una secreción de GnRH incrementada debido a la castración. Así, estos cambios hormonales en los machos castrados, (FSH y LH elevadas y testosterona disminuida), indican la efectividad del tratamiento. Además, estos resultados sugieren que mientras la castración neonatal es efectiva en desmasculinizar y feminizar el control de la secreción de gonadotrofinas, es insuficiente para modificar la expresión del RGABA_B. Es interesante notar que los machos castrados neonatalmente mostraron niveles de T cuantificables, probablemente de origen adrenal (Goodarzi et al., 2003; Rao et al., 2004), en concordancia con reportes previos (Verdonck et al., 1998). Con respecto a las hembras tratadas con 100 µg TP, éstas fueron masculinizadas efectivamente en sus patrones de secreción de gonadotrofinas y niveles de T y también en la expresión del RGABA_B hipofisario.

Si bien estos resultados sugieren que la expresión del RGABA_B está bajo el control de las hormonas esteroideas en etapas tempranas del desarrollo, algunas incertidumbres surgieron de los mismos. ¿Es la castración insuficiente para modificar la expresión del RGABA_B en los machos porque el *imprinting* intrauterino de T ya había ocurrido en estos animales? ¿Es el efecto de la T en las hembras debido a la masculinización neonatal de la expresión del RGABA_B o a los altos niveles de andrógenos circulantes, todavía presentes al momento de tomar las muestras?

Para responder estas preguntas se diseñó un nuevo conjunto de experimentos en animales de 8 días. Además de la castración neonatal, la que suprime el segundo pico masculinizante de andrógenos, en un grupo de machos se abolió el efecto de la

elevación de T intrauterina (primer pico androgenizante) al tratar a ratas preñadas con Flut, un antiandrógeno no esteroideo que bloquea la acción de T y DHT compitiendo por el receptor (Peets et al., 1974; Fitch and Denenberg, 1998; Casto et al., 2003). Más aún, un tercer grupo de machos se expuso al tratamiento embrionario con Flut y se lo castró al nacimiento para abolir ambos picos masculinizantes. Con respecto a las hembras, además del protocolo de androgenización 100 µg TP, se llevó a cabo un segundo esquema de androgenización con dosis mucho más bajas (1 µg TP/ rata durante los días 1-4 postnatales) (McDonald and Doughty, 1974).

Los machos castrados tratados con Flut mostraron un aumento significativo en la expresión de la subunidad RGABA_{B1} cuando se los comparó con los machos controles. En los machos tratados con Flut y castrados neonatalmente, la expresión de la subunidad del RGABA_B fue aún mayor. El antiandrógeno también bloqueó la masculinización de varias características anatómicas dependientes de andrógenos, por ejemplo: los genitales externos, no siendo éstos distinguibles de las hembras al nacimiento. La Flut no modificó las gonadotrofinas ni la expresión del RGABA_B en las hembras. Estos resultados demuestran claramente que la T y/o sus metabolitos (Cooke et al., 1998; Quadros et al., 2002b; Han and De Vries, 2003) juegan roles decisivos en la determinación de la expresión de la subunidad RGABA_{B1} del receptor en la pituitaria en etapas tempranas del desarrollo, estando involucrados ambos picos de androgenización, aunque el intrauterino parece ser el más crítico. Esta hipótesis está apoyada por los resultados obtenidos con- el tratamiento neonatal de las hembras con T.

Por otro lado las hembras tratadas con el protocolo de androgenización con dosis bajas no mostraron alteraciones en la expresión del RGABA_B ni en los niveles de gonadotrofinas a los 8 días de edad. Los niveles de T estaban altos en estos animales,

similares a los de machos controles y hembras tratadas con 100 µg TP, sugiriendo que el efecto observado en la expresión del RGABA_B en el grupo tratado con 100 µg TP no se debió a la presencia de T al momento de tomar la muestra. Aunque este protocolo de androgenización con dosis baja no modificó la expresión del RGABA_B, si alteró profundamente el eje hipotalámico-hipofisario-ovárico en la adultez; estos animales presentaron una apertura vaginal más temprana, en una manera atípica (*pinhole*, como se reportó previamente (McDonald and Doughy, 1974)), niveles de FSH elevados y falta de ciclicidad o picos de gonadotrofinas en la adultez. A su vez, se observaron alteraciones en los cuernos uterinos y el volumen ovárico en las autopsias.

Los resultados obtenidos de los protocolos de androgenización sugieren que si bien ambos son efectivos en alterar el control de la secreción de gonadotrofinas en la adultez, una dosis de T determinada es necesaria para masculinizar la expresión del RGABA_B. Se ha propuesto que estructuras, tejidos, características diferentes pueden exhibir una susceptibilidad diferencial a la acción de andrógenos, requiriendo dosis distintas para que los efectos se observen (Luttge and Whalen, 1970; Sheridan et al., 1973; McDonald and Doughy, 1974).

La evidencia de que las diferencias sexuales en la expresión del RGABA_B es dependiente de esteroides no es una observación aislada, pues se ha propuesto que el GABA y sus receptores juegan papeles claves en la diferenciación sexual del cerebro y en los patrones de secreción hormonal sexualmente dimórficos (Davis et al., 1996a; Murray et al., 1999; Davis et al., 2000).

Dado que se había descripto que el GABA era capaz de modular la expresión de sus propios receptores en el SNC (Schousboe, 1999), decidimos evaluar los niveles de GABA en los hipotálamos de los animales de 8 días pertenecientes a los diferentes

grupos experimentales. Diferentes autores han reportado resultados variables en cuanto a las diferencias sexuales en los niveles de GABA y glutamato en diferentes núcleos y áreas del hipotálamo a lo largo del desarrollo (Flügge et al., 1986; Davis et al., 1999). Llamativamente, en estos experimentos sólo los niveles de GABA hipotalámicos mostraron un patrón paralelo al observado para la expresión del RGABA_B en la pituitaria: los niveles de este neurotransmisor fueron más elevados en las hembras que en los machos y modulados por la manipulación esteroidea en el mismo sentido. Una correlación positiva, significativa, se observó entre ambos parámetros. Ningún otro neurotransmisor medido mostró este patrón en esta área. Tampoco se observaron diferencias en los neurotransmisores entre los diferentes grupos en la corteza, utilizada como tejido control.

El glutamato hipotalámico también mostró diferencias sexuales, siendo los niveles en las hembras controles mayores que en todos los grupos de machos, independientemente de los tratamientos. Otros autores también habían propuesto que los niveles de glutamato no se modificaban por T (Davis et al., 1999). De manera sorprendente, la Flut disminuyó el glutamato en las hembras a niveles de machos, además, una disminución estadísticamente no significativa también fue observada para GABA en las hembras bajo este tratamiento. De nuestro conocimiento, no se han descrito para la Flut efectos androgénicos, estrogénicos ni antiestrogénicos (Neri et al., 1972; Gladue and Clemens, 1980), siendo estos resultados interesantes para ser profundizados en el futuro.

En conclusión, estos resultados demuestran que la T juega un papel clave en la modulación de la expresión sexualmente dimórfica del RGABA_B en la pituitaria y en los niveles de GABA hipotalámicos en estadios tempranos del desarrollo. La exposición prenatal de los machos a andrógenos determina la expresión postnatal de RGABA_{B1} en

la adenohipófisis, mientras que una exposición neonatal elevada de TP puede disminuir los niveles de expresión de RGABA_{B1} normalmente encontrados en las hembras.

CAPÍTULO III:

**Regulación de la expresión de las subunidades del
receptor GABA_B hipofisario por GABA y por
esteroides gonadales**

Introducción

En el capítulo anterior demostramos que las hembras de 8 días de edad expresan mayores niveles de la subunidad RGABA_{B1} en la pituitaria anterior que los machos de la misma edad y que esta expresión estaría regulada negativamente por la presencia de testosterona en los machos. Observamos, a su vez, que los niveles de GABA hipotalámicos seguían el mismo patrón que la expresión del RGABA_B hipofisario, siendo éste el único neurotransmisor de los ensayados en comportarse de esta manera, indicando que sus niveles también podrían estar regulados directa ó indirectamente por testosterona. Estos resultados sugerían que ambos eventos podrían estar relacionados. Nos planteamos dos posibilidades: o bien los niveles de esteroides circulantes modifican en forma paralela los niveles de GABA hipotalámicos y RGABA_{B1} hipofisarios, o una modulación en los niveles de GABA por estos esteroides podría llevar a una regulación en la expresión de los receptores hipofisarios analizados.

Antecedentes bibliográficos indicaban que GABA inducía la expresión de sus propios receptores a nivel del SNC (Schousboe, 1999). Una inducción de RGABA_A fue demostrada en cerebelo y retina (Madtes and Redburn, 1983; Meier et al., 1984). Estos trabajos demostraban además que las subunidades que componen el RGABA_A dependen de la exposición de las neuronas a agonistas GABA_A durante etapas tempranas del desarrollo (Schoubsoe and Redburn, 1995; Carlson et al., 1998). Con respecto al RGABA_B, se demostró en células granulares del cerebelo en cultivo que la estimulación de RGABA_A inducía un aumento en el número de RGABA_B, (Kardos et al., 1994) y que estos receptores inducidos tenían propiedades farmacológicas y funcionales diferentes de los receptores expresados constitutivamente (Kardos et al.,

1994; Vale et al., 1998), sugiriendo que se podría estar favoreciendo la expresión de algún subtipo particular de receptor.

Teniendo en cuenta que nuestros resultados *in vivo* no nos permitían precisar si la acción de los andrógenos sobre la expresión de los RGABA_B adenohipofisarios era un efecto directo o mediado por variaciones en los niveles de GABA decidimos estudiar el efecto de los esteroides gonadales y del GABA sobre la expresión de los RGABA_B en cultivos de células adenohipofisarias de machos y hembras de 5-7 días de edad.

Materiales y Métodos

Cultivos celulares

Las células adenohipofisarias fueron obtenidas como describiéramos previamente (Lux-Lantos et al., 1992; Rey-Roldán et al., 1996). Brevemente, las ratas machos y hembras de 5-7 días de edad fueron sacrificadas por decapitación y las hipófisis fueron rápidamente removidas en hielo, separadas de la neurohipófisis y ubicadas en cámaras conteniendo *buffer* Krebs-Ringer bicarbonato pH 7.3 sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} recién preparado. Este *buffer*, conteniendo glucosa 14 mM, aminoácidos esenciales 2%, vitaminas esenciales 1% y glutamina 2 mM, fue gaseado 15 min. con 95% O_2 - 5% CO_2 , se le añadió BSA 1% y se lo esterilizó por filtración a través de membrana (tamaño de poro: 0.45 μm). Las hipófisis fueron lavadas con el *buffer* y cortadas en pequeños trozos con un bisturí estéril. Luego fueron incubadas en tripsina 0.2 % (GIBCO, Grand Island, NY) preparada en el mismo *buffer*) por 10 min. en estufa a 37 °C con una atmósfera de 5 % CO_2 . A continuación se incubaron 1 minuto con DNasa I (1.2 mg/ml, Worthington, Freehold NJ) y finalmente se detuvo la digestión enzimática con el agregado del inhibidor de tripsina obtenido de poroto de soja LBI (1mg/ml, GIBCO). Los fragmentos fueron lavados, dispersados en células individuales por trituración suave a través de pipetas Pasteur de plástico y filtrados a través de una malla de nylon Nytex (160 μm). La suspensión celular resultante fue centrifugada a 1.000 rpm durante 10 min. Las células fueron resuspendidas en medio Dulbecco modificado suplementado con suero de caballo 10 %, suero fetal bovino 2.5 %, MEM aminoácidos no esenciales 1 % (GIBCO), fungizone (GIBCO) y gentamicina (PPA Laboratories GMBH, Linz, Austria) ambas a 25 ng/ml. Para cuantificar la suspensión celular se tomó una alícuota de la misma y se procedió al conteo en una cámara de Neubauer. La viabilidad celular se

determinó por el método de exclusión de Azul Tripán. Finalmente la suspensión celular fue llevada a la densidad celular de trabajo. En este caso se sembraron aproximadamente 400.000 células por pocillo en una placa de cultivo P24 y en ese momento se agregaron los estímulos: GABA (1.10^{-6} , 1.10^{-5} o 1.10^{-4} M) sólo ó, la concentración mayor, en combinación con Bicuculina, antagonista de los $RGABA_A$ (1.10^{-4} M) ó 2 hidroxisaclofen, antagonista de los $RGABA_B$ (1.10^{-4} M), o medio Dulbecco como control. Las incubaciones se desarrollaron por 72 horas, con renovación de estímulos cada 12 horas. Luego del tiempo indicado las placas de cultivo fueron puestas en hielo, se recolectaron y congelaron los medios de cultivo para la posterior medición de los niveles hormonales por RIA. Las placas fueron lavadas con PBS estéril frío y posteriormente se les agregó TriZol para la obtención del ARN.

Obtención del ARN

La obtención de ARN se realizó como en el capítulo anterior.

Expresión del ARNm de la subunidades $RGABA_{B1}$ y $RGABA_{B2}$ por RT-PCR

Para la detección de los ARNm de $RGABA_{B1}$ y de β actina se procedió de la misma manera que en el capítulo anterior.

PCR de ADNc del $RGABA_{B2}$

Para la amplificación del ADNc de $RGABA_{B2}$, se emplearon alícuotas de 2 μ l de la reacción de RT por PCR. Se incluyó un control negativo de reacción carente de templado en cada experimento. Esta PCR consistió de una incubación inicial de 5 min. a 95 °C (*hot start*) seguida por 29 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min., apareamiento a 55 °C por 1 min. y extensión a 72 °C por 1 min.; con una extensión final

de 10 min. a 72°C luego del último ciclo. Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo usando la enzima Taq DNA polimerasa y primers de oligonucleótidos específicos. Estos fueron sintetizados basándonos en las secuencias publicadas por Mayerhofer y col. (Mayerhofer et al., 2001): *forward*: 5'-CATCATCTTCTGCAGCAC-3'; *reverse*: 5'-TCTGTGAAGTTGCCCAAG-3' amplificando un fragmento teórico de 354 bp a partir del ARNm (Bio Synthesis, USA). Los controles de PCR y la cuantificación de los fragmentos obtenidos se realizó igual que en el Capítulo II.

A fin de validar el ensayo para las mediciones de RGABA_{B2}, diferentes cantidades del ARN total fueron retrotranscriptas y alícuotas fueron amplificadas con los *primers* específicos por distinto número de ciclos. Se obtuvo una relación linear entre los µg de ARN y los productos de PCR (Figura III.1A). Como resultado, 0.5 µg del ARN total fue usado en las reacciones de RT. Una relación linear entre los productos de PCR y el número de ciclos también fue obtenida cuando se usaron 0.5 µg de ARN total en la RT (Figura III.1B). Como resultado 29 ciclos de amplificación de PCR fueron seleccionados para RGABA_{B2}. Finalmente, una relación linear en la detección también fue lograda cuando diferentes cantidades de ADNc, obtenidas por retro-transcripción de 0.5 µg de ARN, fueron sometidas a PCR (Figura III.1C).

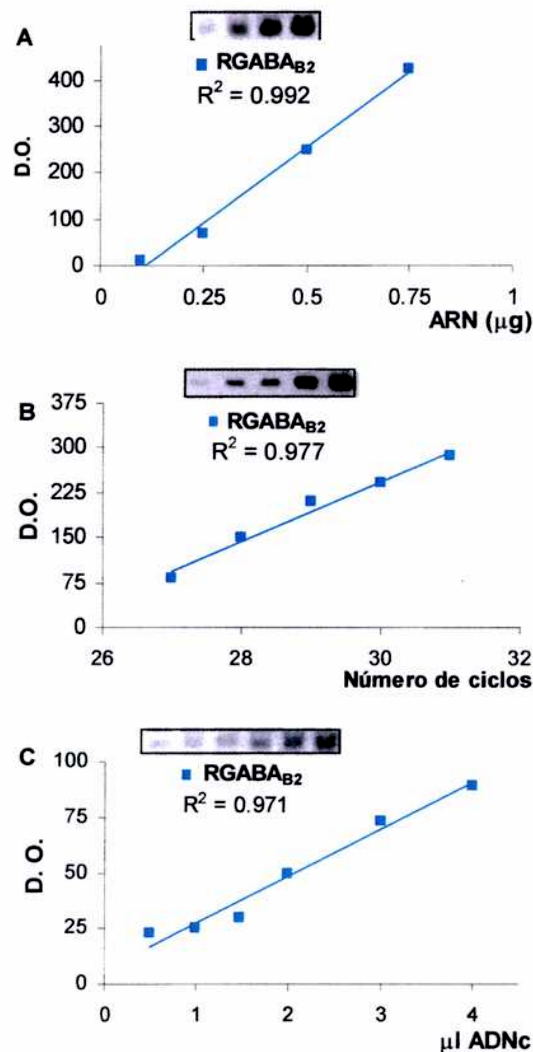


Figura III.1: Validación de la RT-PCR semicuantitativa para la subunidad RGABA_{B2}.

ARN total de pituitarias fue retro-transcripto. Una relación lineal fue observada entre la densidad óptica de los productos de PCR y: A) μg de ARN; B) número de ciclos cuando 0.5 μg de ARN fueron retro-transcriptos y C) μl de ADNc cuando 0.5 μg de ARN fueron retro-transcriptos y amplificados por 29 ciclos para la subunidad RGABA_{B2}. Una curva representativa se muestra para cada caso.

Radioinmunoensayos de hormonas peptídicas

RIA de LH y FSH

Las gonadotrofinas fueron determinadas por RIA como en el capítulo anterior. Los resultados fueron expresados en términos de los estándares de LH y FSH de rata RP₃. Las sensibilidades de estos ensayos fueron de 3 ng/ml para LH y 1.96 ng/ml para FSH.

RIA de PRL

El protocolo utilizado fue similar al empleado para la medición de gonadotrofinas. Se utilizaron 5µg de PRL de rata purificada (NIDDK rPRL-I-6), con una actividad biológica de 30 UI/mg por el análisis de Nicoll del buche de paloma, y contaminación con somatotrofina y tirotrofina menor al 0.3%. El método de marcación fue semejante al descrito en el capítulo II. El primer antisuero contra PRL de rata fue NIDDK-anti-rat-PRL-RIA-9 obtenido al inmunizar conejos con PRL de rata altamente purificada semejante a la NIDDK-rPRL-I-6. El mismo se diluyó a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo (entre 1:1500 y 1:2500). El estándar de referencia fue PRL de rata NIDDK-rPRL-RP-3, con una actividad biológica de 30 UI/mg. La curva patrón se extiende de 0.0396 a 10 ng por tubo. Los resultados se expresaron según los estándares RP₃ de rata para PRL. La sensibilidad de los ensayos fue 1.98 ng/ml y los coeficientes de variación intra e interensayos fueron 8.1% y 11.4%.

Análisis estadísticos

Las diferencias en los niveles hormonales y los niveles del ARNm de RGABA_{B1} y de RGABA_{B2} fueron analizadas por ANOVA en dos sentidos seguidos por el *test a posteriori* de Student Newman-Keuls (Statistica v 5). Los datos fueron transformados cuando el *test* para homogeneidad de varianzas y/o de normalidad así lo requerían. La interacción se acepta como significativa cuando el p es menor o igual al 10%.

Resultados

Expresión del ARNm de las subunidades RGABA_{B1} y RGABA_{B2} en células adenohipofisarias de ratas hembras y machos estimuladas con GABA

Los niveles basales de expresión de RGABA_{B1} fueron similares entre las células de hembras y las de machos [ARNm RGABA_{B1} (UA): hembras: 0.43 ± 0.04 vs. machos: 0.45 ± 0.14 , ns] luego de 72 horas de cultivo.

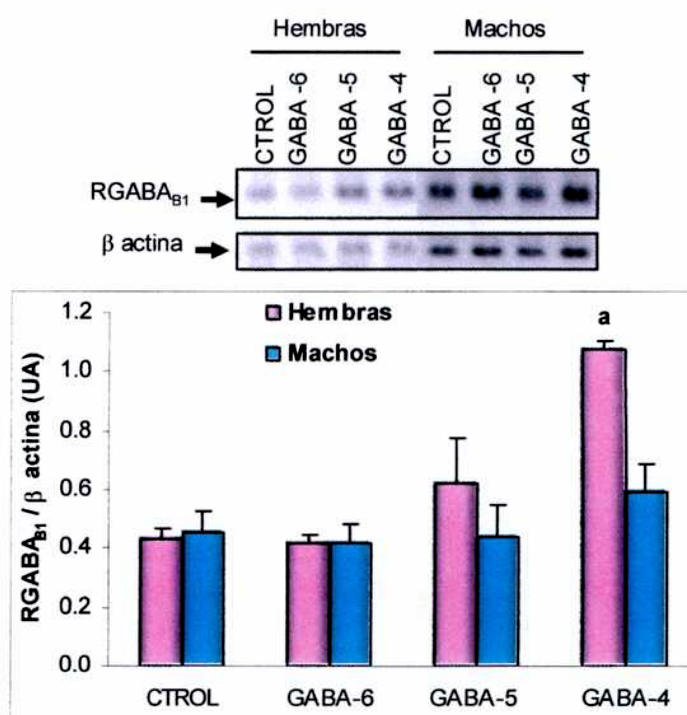


Figura III.2: Expresión del ARNm de la subunidad RGABA_{B1} relativa a la expresión de β actina en cultivos de células hipofisarias de ratas hembras y machos de 5-7 días en presencia o ausencia de GABA 1.10^{-6} , 1.10^{-5} y 1.10^{-4} M luego de 72 horas de cultivo.

Los datos (n= 5 cultivos) fueron analizados por ANOVA en dos sentidos tomando como factores el sexo y los tratamientos, interacción: $p < 0.008$, a: significativamente mayor a todos los otros grupos.

La estimulación con GABA indujo un aumento en la expresión del ARNm de RGABA_{B1} en células hipofisarias de ratas hembras, la cual alcanzó significación

estadística a una concentración de $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$. Por otro lado en las células adenohipofisarias de los machos no se observó ningún efecto de GABA sobre a la expresión del ARNm de la subunidad RGABA_{B1} a ninguna de las dosis empleadas (Figura III.2).

Al evaluar si el GABA ejercía su efecto a través de los RGABA_{A} o RGABA_{B} , se observó en los cultivos adenohipofisarios de hembras una reversión del efecto con cada uno de los antagonistas específicos, sugiriendo que el efecto se ejercería a través de ambos tipos de receptores. En las células adenohipofisarias de machos no se observó efecto de GABA ni un efecto *per se* de estos antagonistas sobre la expresión del ARNm de la subunidad RGABA_{B1} (Figura III.3).

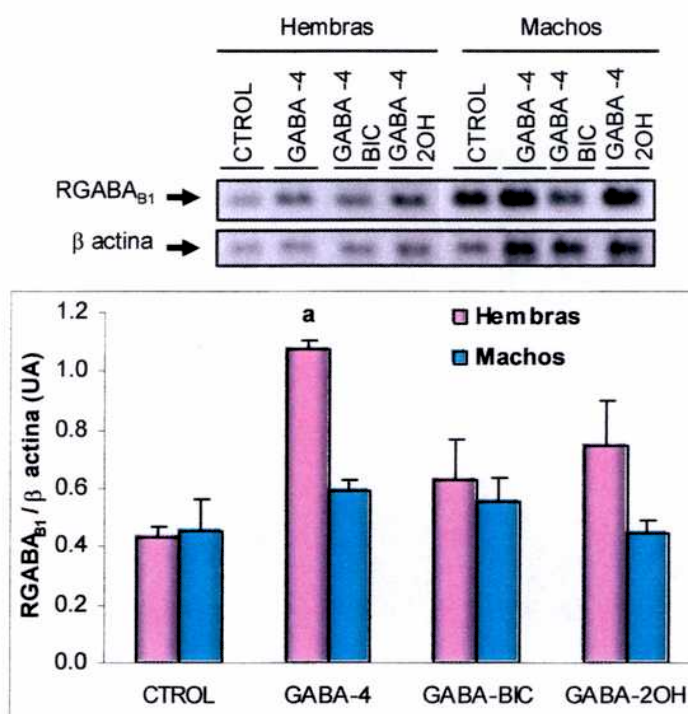


Figura III.3: Expresión del ARNm de la subunidad RGABA_{B1} relativa a la expresión de β actina en cultivos de células hipofisarias de ratas hembras y machos de 5-7 días en presencia o ausencia de GABA $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$ y los antagonistas del receptor tipo A: Bicuculina (BIC: $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$) o del receptor tipo B: 2 hidroxisaclofen (2OH: $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$) luego de 72 horas de cultivo.

Los datos ($n = 5$ cultivos) fueron analizados por un ANOVA en dos sentidos tomando como factores el sexo y los tratamientos. interacción: $p < 0.08$. a: distinto de todos los otro grupos.

En cuanto a la subunidad RGABA_{B2}, los niveles basales de expresión fueron similares entre las células de hembras y las de machos [ARNm RGABA_{B2} (UA): hembras: 1.67 ± 0.05 vs. machos: 1.12 ± 0.11 , ns].

La estimulación con GABA no indujo ningún cambio sobre los niveles del ARNm de la subunidad RGABA_{B2} en células hipofisarias de ratas hembras y machos, ni aún a la concentración más alta del agonista. Además, los antagonistas específicos para los subtipos A y B del receptor tampoco tuvieron un efecto *per se* sobre dicha expresión (Figura III.4).

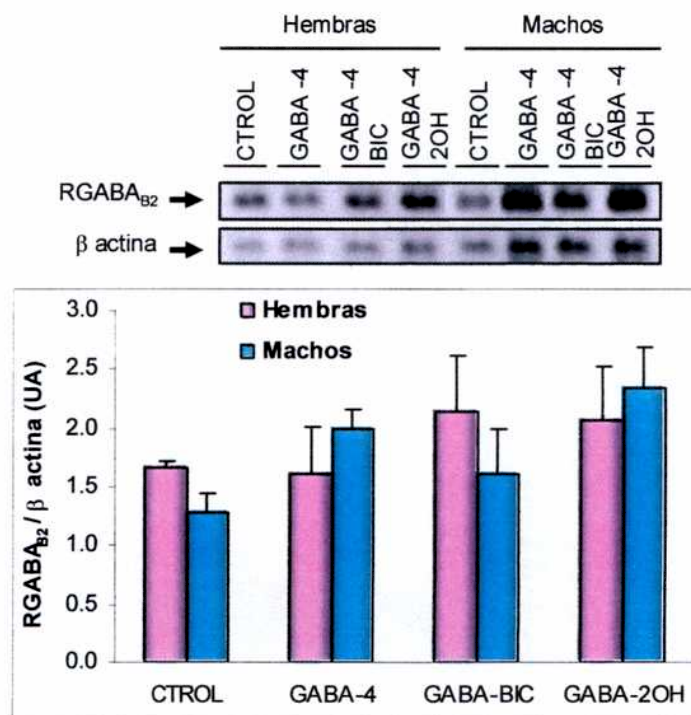


Figura III.4: Expresión del ARNm de la subunidad RGABA_{B2} relativa a la expresión de β actina en cultivos de células hipofisarias de ratas hembras y machos de 5-7 días en presencia o ausencia de GABA 1.10^{-4} M y los antagonistas del receptor tipo A: Bicuculina (BIC: 1.10^{-4} M) o del receptor tipo B: 2 hidroxisaclofen (2OH: 1.10^{-4} M) luego de 72 horas de cultivo.

Los datos (n= 3 cultivos) fueron analizados por un ANOVA en dos sentidos tomando como factores el sexo y los tratamientos. ANOVA: ns.

Incubaciones realizadas en presencia de ácido aminooxiacético, un inhibidor de la GABA-T (50 μ M y 500 μ M), para inhibir la degradación de GABA añadido a las células, no modificaron los resultados arriba mencionados (no se muestran).

Efecto del GABA sobre los niveles de hormonas hipofisarias

Los niveles basales de secreción de PRL fueron similares entre las células adenohipofisarias de machos y de hembras luego de 72 horas de cultivo [PRL (n/ml): machos: 51.1 ± 12.6 vs hembras: 49.6 ± 10.3 , ns].

El GABA indujo una inhibición de la secreción de PRL en ambos sexos a las tres dosis estudiadas (Figura III.5).

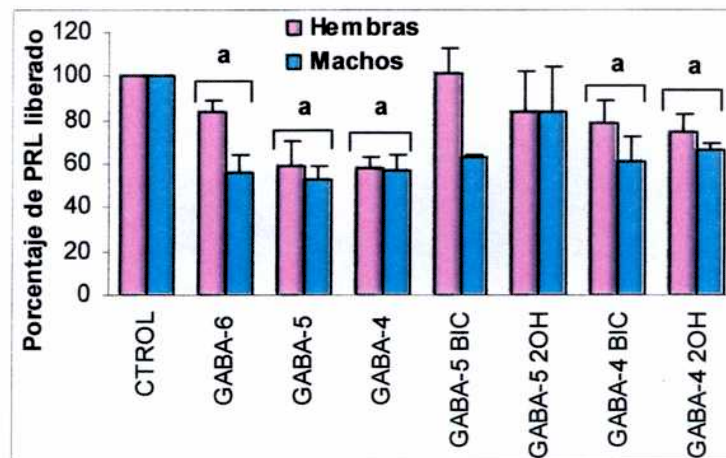


Figura III.5: Niveles de PRL, expresados como porcentaje respecto del control en células adenohipofisarias de ratas hembras y machos de 5-7 días de edad luego de 72 horas de cultivo en presencia de GABA en distintas concentraciones y co-incubando con los antagonistas específicos de los RGABA_A (BIC: $1 \cdot 10^{-4}$ M) o RGABA_B (2OH: $1 \cdot 10^{-4}$ M).

Los resultados fueron analizados por ANOVA en dos sentidos: interacción: ns, indicando que las células adenohipofisarias de ambos sexos responden de manera semejante ante los estímulos, factor sexo: $p < 0.006$, factor tratamiento: $p < 0.045$, a: distinto del control.

Tanto la Bicuculina (BIC) como el 2-OH saclofen (2OH) fueron capaces de revertir parcialmente este efecto frente a la concentración de GABA $1 \cdot 10^{-5}$ M; no siendo capaces

de revertir la inhibición inducida por la concentración más alta del neurotransmisor ($1.10^{-4}M$) en las células adenohipofisarias de ambos sexos. La respuesta en términos de inhibición de la secreción de PRL fue en general mayor en machos que en hembras ($p<0.006$).

El efecto de la BIC de revertir la respuesta al GABA parece ser mayor en hembras que en machos, aunque no alcanza significación estadística ya que la interacción da no significativa en el ANOVA en dos sentidos. Sin embargo, si analizamos los resultados para cada sexo por separado se observa que BIC revierte totalmente el efecto de GABA $1.10^{-5}M$ en las hembras mientras que en el macho la reversión es sólo parcial.

Al analizar la secreción de gonadotrofinas en estos cultivos se observó una diferencia significativa en los niveles basales de secreción, siendo mayor en las hembras que en los machos [LH (ng/ml): machos: 105.3 ± 7.8 vs hembras: 197.0 ± 24.6 , $n=5$, $p<0.02$; FSH (ng/ml): machos: 24.5 ± 2.7 vs hembras: 43.9 ± 7.9 , $p<0.02$].

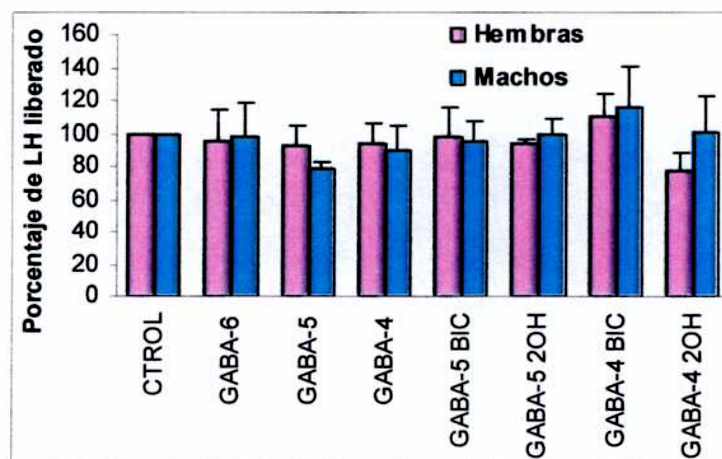


Figura III.6: Niveles de LH, expresados como porcentaje respecto del control en células adenohipofisarias de ratas hembras y macho de 5-7 días de vida luego de 72 horas de cultivo en presencia de GABA en distintas concentraciones y co-incubando con los antagonistas específicos de los receptores A (BIC: $1.10^{-4}M$) o B (2OH: $1.10^{-4}M$), ANOVA: ns.

Ninguna de las gonadotrofinas fue modificada significativamente por la incubación con GABA en ningún tipo celular con este protocolo de cultivo (Figuras III.6 y III.7).

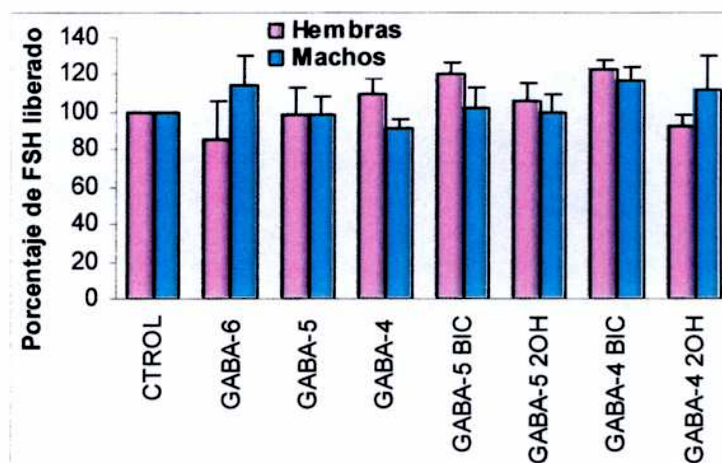


Figura III.7: Niveles de FSH, expresados como porcentaje respecto del control en células adenohipofisarias de ratas hembras y ratas machos de 5-7 días de edad luego de 72 horas de cultivo en presencia de GABA en distintas concentraciones y co-incubando con los antagonistas específicos de los receptores A (BIC: $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$) o B (2OH: $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$). ANOVA: ns.

Expresión del ARNm de las subunidades RGABA_{B1} y RGABA_{B2} del receptor GABA_B en células adenohipofisarias de ratas hembras y machos estimuladas con esteroides gonadales

Los esteroides sexuales ensayados, estradiol (E_2), testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT), no modificaron los niveles de expresión del ARNm de la subunidad RGABA_{B1} en células adenohipofisarias de ratas hembras ni machos luego de 72 horas de cultivo. La Flut, un antiandrógeno, tampoco tuvo efecto sobre la expresión de esta subunidad del RGABA_B (Figura III.8).

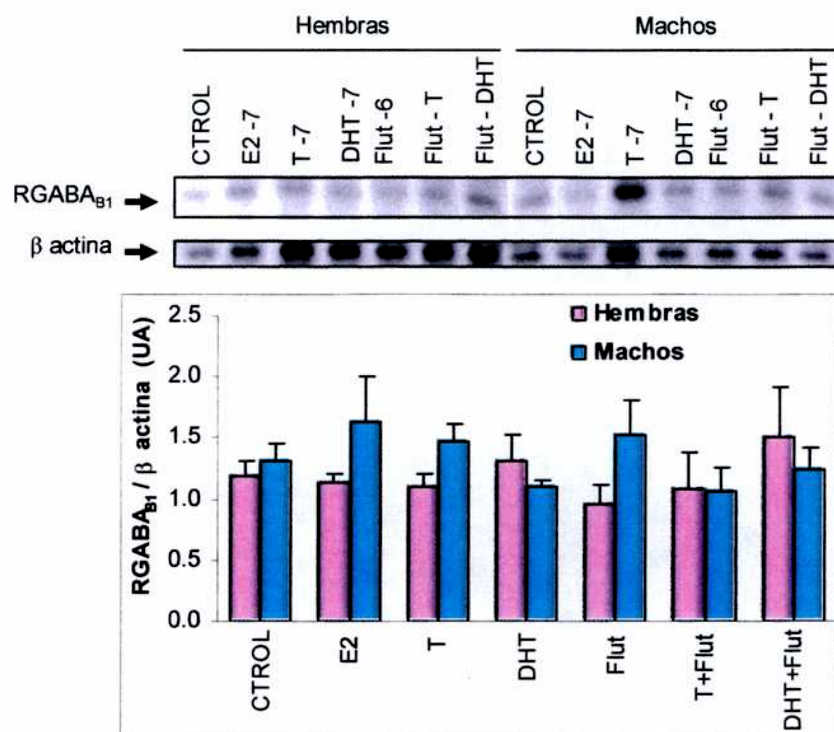


Figura III.8: Expresión del ARNm de la subunidad RGABA_{B1} relativa a la expresión de β actina en cultivos de células hipofisarias de ratas hembras y machos de 5-7 días en presencia estradiol (E₂: 1.10⁻⁷M), testosterona (T: 1.10⁻⁷M) o dihidrotestosterona (DHT: 1.10⁻⁷M), el antiandrógeno Flutamida (FLUT: 1.10⁻⁶M) y la combinación de T o DHT con FLUT, luego de 72 horas de cultivo. ANOVA en dos sentidos tomando como factores sexo y tratamientos, ns (n= 4-5 cultivos).

Por otro lado el tratamiento con los andrógenos incrementó significativamente la expresión de la subunidad RGABA_{B2} en las células hipofisarias de ambos sexos (Figura III.9). La coincubación con Flut fue capaz de revertir este efecto de los andrógenos, mientras que Flut no tuvo efecto *per se*.

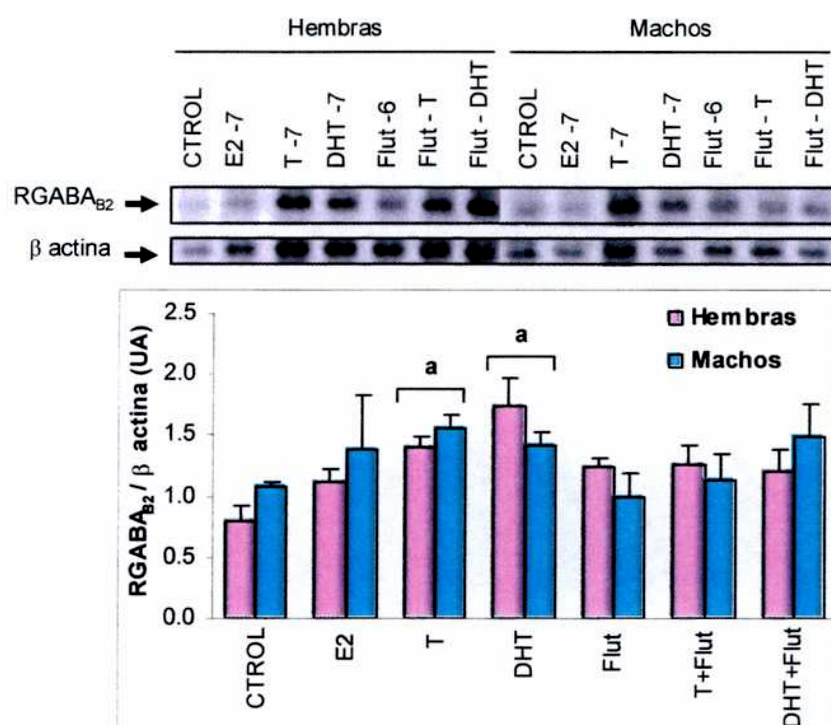


Figura III.9: Expresión del ARNm de la subunidad RGABA_{B2} relativa a la expresión de β actina en cultivos de células hipofisarias de ratas hembras y machos de 5-7 días en presencia de estradiol (E₂: 1.10⁻⁷M), testosterona (T: 1.10⁻⁷M) o dihidrotestosterona (DHT: 1.10⁻⁷M), el antiandrógeno Flutamida (FLUT: 1.10⁻⁶M) y la combinación de T o DHT con FLUT, luego de 72 horas de cultivo.

ANOVA en dos sentidos tomando como factores sexo y tratamientos: interacción: ns, factor sexo: ns, factor tratamiento: p<0.02 (n= 4-5 cultivos). a: distinto de control.

Efecto de los esteroides gonadales sobre los niveles de hormonas hipofisarias

En estos cultivos también se determinó el efecto de los esteroides gonadales sobre la secreción adenohipofisaria. El E₂ incrementó significativamente la secreción de PRL en células hipofisarias de machos y hembras, mientras que los andrógenos no tuvieron efecto sobre la secreción de esta hormona (Figura III.10). En general el nivel de respuesta fue mayor en machos que en hembras.

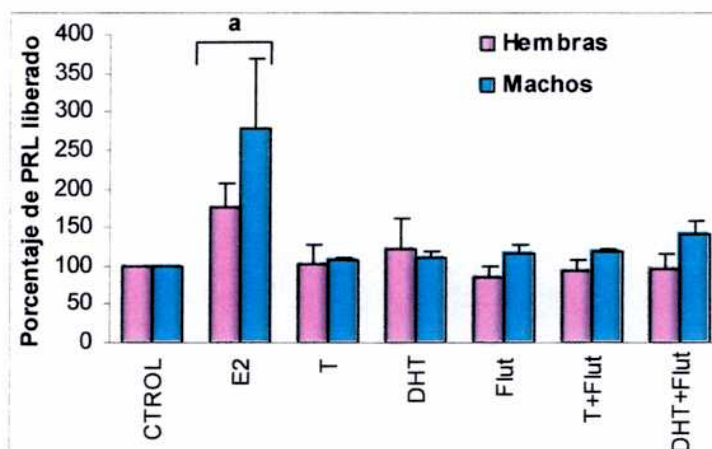


Figura III.10: Niveles de PRL, expresados como porcentaje respecto del control en células adenohipofisarias de ratas hembras y machos de 5-7 días de edad luego de 72 horas de cultivo en presencia de E_2 : $1.10^{-7}M$, T: $1.10^{-7}M$ o DHT: $1.10^{-7}M$, FLUT: $1.10^{-6}M$ y la combinación de T o DHT con FLUT.

Los resultados fueron analizados por ANOVA en dos sentidos: interacción: ns, indicando que las células adenohipofisarias de ambos sexos responden de manera semejante ante los estímulos, factor sexo: $p < 0.04$, factor tratamiento: $p < 0.001$. a: distinto de todos.

Con respecto a las gonadotrofinas se observó que DHT inhibió significativamente la secreción de LH en ambos sexos y que su efecto no fue revertido por Flut (Figura III.11); aquí también se observó que en general el nivel de respuesta fue mayor en machos que en hembras. T y DHT incrementaron significativamente la secreción de FSH en células de ambos sexos y nuevamente Flut no pudo revertir este efecto (Figura III.12). Para esta hormona el nivel de respuesta frente a la estimulación con los andrógenos fue mayor en las hembras que en los machos.

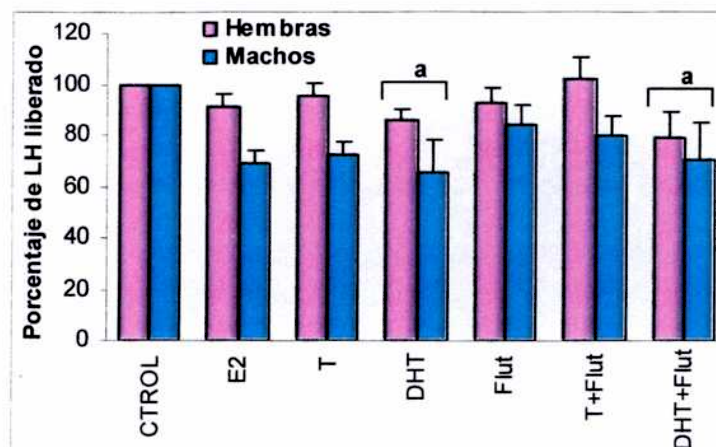


Figura III.11: Niveles de LH, expresados como porcentaje respecto del control en células adenohipofisarias de ratas hembras y machos de 5-7 días de edad luego de 72 horas de cultivo en presencia de E_2 : $1.10^{-7}M$, T: $1.10^{-7}M$ o DHT: $1.10^{-7}M$, FLUT: $1.10^{-6}M$ y la combinación de T o DHT con FLUT.

Los resultados fueron analizados por ANOVA en dos sentidos: interacción: ns, indicando que las células adenohipofisarias de ambos sexos responden de manera semejante ante los estímulos, factor sexo: $p < 0.01$, factor tratamiento: $p < 0.03$. a: distinto de control.

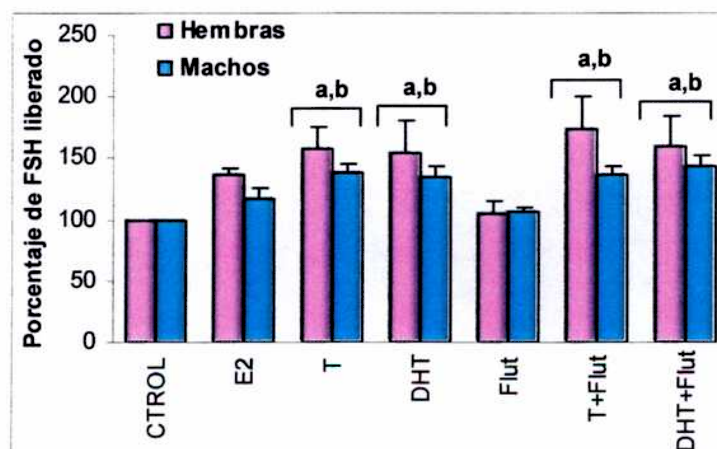


Figura III.12 Niveles de FSH expresados como porcentaje respecto del control en células adenohipofisarias de ratas hembras y machos de 5-7 días de edad luego de 72 horas de cultivo en presencia de E_2 : $1.10^{-7}M$, T: $1.10^{-7}M$ o DHT: $1.10^{-7}M$, FLUT: $1.10^{-6}M$ y la combinación de T o DHT con FLUT.

Los resultados fueron analizados por ANOVA en dos sentidos: interacción: ns, indicando que las células adenohipofisarias de ambos sexos responden de manera semejante ante los estímulos, factor sexo: $p < 0.04$ factor tratamiento: $p < 0.001$, a: distinto de control, b: distinto de Flut.

Discusión

En estos experimentos hemos demostrado que el GABA es capaz de estimular la expresión de la subunidad $RGABA_{B1}$ sólo en células hipofisarias de hembras. Esta característica del GABA de inducir un aumento de sus propios receptores ya había sido descrita en SNC, donde se postulaba que este efecto se realiza a través de la estimulación de $RGABA_A$ (Kardos et al., 1994). Es más, estos resultados demuestran una clara diferencia sexual en este efecto, sumándose a las diferencias sexuales que se observan en otros aspectos de este sistema. En el caso de la subunidad $RGABA_{B1}$ hipofisaria, la estimulación de la expresión del ARNm por GABA parecería ser ejercida a través de ambos receptores, $RGABA_A$ y $RGABA_B$, ya que antagonistas específicos de cada uno de ellos revierten este efecto. Es conocido que el GABA puede inducir la transcripción de genes al modular la activación de factores de transcripción. Se ha descrito que el GABA modifica los niveles de fosforilación de la proteína ligadora del elemento respondedor a AMPc (CREB y otras proteínas asociadas) en forma diferencial en ratas machos y hembras recién nacidas en áreas específicas del SNC, efecto que se produciría a través de los $RGABA_A$ (Auger et al., 2001; Perrot-Sinal et al., 2003). Más aún, se ha propuesto que los $RGABA_B$ pueden interactuar directamente con los factores de transcripción ATF4 y ATFx, pertenecientes a la familia del CREB, estimulando la expresión génica, sin embargo no se conoce aún si existen diferencias sexuales en estos efectos (Nehring et al., 2000; White et al., 2000).

Es interesante señalar que los niveles basales del ARNm de la subunidad $RGABA_{B1}$ son similares en las células adenohipofisarias de machos y hembras, lo que sugeriría que en la condición desregulada (carente de influencias periféricas y del SNC) el nivel de expresión es semejante entre los sexos. Sin embargo, la posibilidad de respuesta ante

un estímulo como el GABA es claramente sexualmente diferenciada. Esta observación abre interrogantes respecto de la presencia de factores que podrían estar bloqueando el efecto del GABA en el macho. Esto podría deberse a factores presentes en las células en cultivo que específicamente impiden la acción inductora del GABA en las células de machos. También se podría postular que el GABA ejercería efectos diferenciales a nivel de la inducción de factores de transcripción, como fuera descrito para ciertas áreas del SNC durante etapas tempranas del desarrollo (Auger et al., 2001; Perrot-Sinal et al., 2003). Además, se puede formular una hipótesis que considere que algún factor presente *in vivo* en los machos (previo a la incubación *in vitro* de las células hipofisarias) habría condicionado a estas células tornándolas refractarias al estímulo con GABA *in vitro*. Un factor a tener en cuenta en esta hipótesis es la testosterona, ya que en el animal entero este esteroide induce la caída de los RGABA_B hipofisarios (en machos ó hembras tratadas con TP) y es, en general, un factor marcadamente asociado a la diferenciación sexual de muchos caracteres.

La falta de efecto en el macho claramente no se debe a una falta de receptores para GABA, ya que la respuesta hipoprolactinémica está presente en estas células y es más potente que en las de hembras. Este efecto hipoprolactinémico del GABA observado a través de ambos tipos de receptores está de acuerdo con resultados previos de nuestro laboratorio (Fischer de Plazas et al., 1982; Lux-Lantos et al., 1992; Lux-Lantos et al., 2001) y con la bibliografía en general (Grandison, 1981; Loeffler et al., 1986; Anderson and Mitchell, 1986a). Es interesante notar que estos resultados demuestran que ya en etapas muy tempranas de desarrollo los receptores gabaérgicos hipofisarios son funcionales y promueven respuestas inhibitorias como en células de animales adultos. La falta de efecto del GABA sobre la secreción basal de gonadotrofinas en cultivos prolongados, concuerda con trabajos previos del laboratorio (Lux-Lantos et al., 1992;

Rey-Roldán et al., 1996; Lux-Lantos et al., 2001) y con la literatura en general, si bien algunos autores proponen un efecto estimulador del GABA sobre las gonadotrofinas a través de RGABA_A en modelos de perfusión o cultivos cortos (Anderson and Mitchell, 1986c; Virmani et al., 1990).

Por otro lado, en los experimentos con los esteroides sexuales hemos demostrado que tanto la T como la DHT son capaces de estimular la expresión de la subunidad RGABA_{B2} en las células hipofisarias de ambos sexos, sin modificar los niveles de la subunidad RGABA_{B1}. Estos efectos parecerían deberse principalmente a la acción directa de los andrógenos sobre sus propios receptores y no vía aromatización, dado que los mismos son bloqueados por la Flut. Una regulación de los RGABA_B por hormonas gonadales, tanto a nivel de expresión como a nivel de señalización intracelular ha sido postulada por otros autores (Kelly et al., 1992; al Dahan et al., 1994; al Dahan and Thalmann, 1996; Lagrange et al., 1996; Kelly and Wagner, 1999). A su vez, nuestros resultados demuestran la existencia de una regulación diferencial en la expresión de las subunidades del RGABA_{B1} y RGABA_{B2} en las células adenohipofisarias. Esto ha sido ampliamente postulado sobre la base de los patrones de expresión diferenciales de ambas subunidades, observados en diversas áreas del sistema nervioso y de tejidos periférico (Kim et al., 2003; Fritschy et al., 2004; Li et al., 2004). De nuestro conocimiento ésta es la primera vez que se describe esta regulación diferencial para cada subunidad en células de la hipófisis anterior.

En cuanto a la acción de los esteroides gonadales sobre la secreción adenohipofisaria, observamos el típico efecto hiperprolactinémico de los estrógenos (Suarez et al., 2002) sin que los mismos modifiquen los niveles de las gonadotrofinas tanto en hembras como en machos. Por el contrario los andrógenos no alteraron la

secreción de PRL pero sí la de las gonadotropinas en células de ambos sexos. Si bien tanto T como DHT incrementan la secreción de FSH (Fink, 1988), sólo la DHT fue capaz de inhibir la liberación de LH. Estos efectos no fueron revertidos por la Flut. Es llamativo que la Flut no haya revertido los efectos de los andrógenos sobre la secreción gonadotrófica, ya que sí fue efectiva en revertir sus acciones sobre los niveles del RGABA_{B2} así como también en los estudios *in vivo*. Los niveles de respuesta frente a estos estímulos fueron diferentes para todas las hormonas hipofisarias analizadas entre los sexos. Esto, junto a la diferencia en los niveles basales de gonadotropinas como en los niveles de respuesta hipoprolactinémica frente a la estimulación con GABA, es indicio de la existencia de un dimorfismo sexual en la propia hipófisis ya a edades tempranas de desarrollo, independientemente de las influencias ejercidas por el SNC a través del hipotálamo.

En su conjunto los resultados *in vitro* indicarían una regulación diferencial de los genes que codifican para subunidades del RGABA_B. La ausencia de un efecto directo de los esteroides sexuales sobre la expresión de la subunidad RGABA_{B1}, señala que los efectos observados *in vivo* serían probablemente indirectos, mediante la regulación de los niveles de GABA, quien sí es capaz de alterar dicha expresión. Así, si los altos niveles de GABA hipotalámicos observados *in vivo* en ratas hembras de 8 días de edad (capítulo II) alcanzaran la hipófisis anterior, éstos podrían estimular la expresión del ARNm de la subunidad RGABA_{B1}, justificando su elevado grado de expresión a nivel de mensajero y de proteína a esta edad en forma diferencial con el macho. Por el contrario se observa un efecto directo, estimulador de los andrógenos sobre la expresión de RGABA_{B2} en ambos sexos. En este punto es importante señalar que si bien se necesitan ambas subunidades para una adecuada expresión del RGABA_B, la subunidad RGABA_{B1} es fundamental para la actividad del mismo ya que ratones

knockout para este gen carecen completamente de respuesta GABA_B (Schuler et al., 2001) mientras que los ratones *knockout* para el gen de RGABA_{B2} son capaces de presentar algunas respuestas GABA_B, aunque atípicas (Gassmann et al., 2004).

CAPÍTULO IV:

**Receptores GABA_B en células adenohipofisarias:
mecanismo de acción acoplados a efectos
endócrinos**

Introducción

En el SNC los RGABA_B metabotrópicos inhiben la actividad neuronal a través de proteínas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G_{i/o}) acoplados a sistemas generadores de segundos mensajeros. La subunidad α estimulada de esta proteína inhibe la adenilil ciclasa mientras que, las subunidades $\beta\gamma$ alteran la conductancia del Ca²⁺ o del K⁺ a través de la membrana, según la localización pre- o post- sináptica del receptor (Bowerly and Brown, 1997; Bettler et al., 1998).

En trabajos previos demostramos que la activación de los RGABA_B por el agonista específico Baclofen tenía efectos inhibitorios directos sobre la secreción adenohipofisaria. La secreción de PRL en las células de hembras adultas en proestro o lactantes es inhibida en las condiciones basal y estimulada, mientras que LH y FSH son inhibidas sólo bajo condiciones estimuladas en células adenohipofisarias de ratas hembras infantiles o en proestro (Lux-Lantos et al., 1992; Rey-Roldán et al., 1996). Es más, en el capítulo anterior también demostramos que en células hipofisarias de ratas machos y hembras de 5-7 días de edad el GABA también ejercería efectos inhibitorios sobre la secreción hormonal a través de sus receptores A y B. Sin embargo, poco se conocía acerca del acople de los RGABA_B a sistemas de segundos mensajeros o a canales iónicos en la pituitaria. En consecuencia, el propósito de este capítulo fue determinar las vías de señalización intracelulares involucradas ante a la activación de RGABA_B pituitarios y su relación con la funcionalidad hipofisaria.

Materiales y métodos

Animales

Se seleccionaron ratas hembras en proestro como donantes de pituitarias porque son muy sensibles a estímulos liberadores de PRL (Lean et al., 1977). Para los estudios sobre la acción del Baclofen sobre la liberación hormonal adenohipofisaria, se utilizó una segunda fuente de células hipofisarias, ratas hembras de 15 días; estas células fueron seleccionadas porque, en esta etapa del desarrollo, los gonadotropos son más abundantes y más sensibles a estímulos liberadores (Becu-Villalobos et al., 1997). Los animales fueron sacrificados por decapitación a las 9.00 a.m.

Células anterohipofisarias

Las células adenohipofisarias fueron obtenidas como fuera descrito en el capítulo anterior y en trabajos previos (Lux-Lantos et al., 1992; Rey-Roldán et al., 1996) tanto para los cultivos celulares como para los experimentos de medición de calcio (Ca^{2+}) intracelular.

Cultivo en monocapa de células adenohipofisarias

Los cultivos se realizaron como en el capítulo III. Las células adenohipofisarias se plaquearon en placas p-96 (50.000 células/pocillo) con medio Dulbecco. Luego de tres días de cultivo, las células fueron incubadas 20 horas en presencia o ausencia de toxina de Pertussis (PTX: 150 ng/ml), lo cual conduce a la ADP-ribosilación de las subunidades α de las proteínas G_i y G_o y al desacople de la proteína G del receptor. Las células fueron lavadas dos veces con medio 199 libre de suero conteniendo BSA 0.1 % y ácido ascórbico 0.1 mM (medio 2). Las células anterohipofisarias de ratas hembras en

proestro fueron incubadas 2 horas con *L*-Baclofen, un agonista GABA_B, en un rango de concentraciones de 1.10^{-7} a 1.10^{-5} M, dopamina (DA: 1.10^{-8} M) o medio 199 como control. Después, se agregó TRH (1.10^{-7} M) o *buffer* y los cultivos se continuaron por otros 60 min. Las células de las ratas hembras de 15 días fueron preincubadas con *L*-Baclofen como lo descrito anteriormente y luego se agregó GnRH 1.10^{-9} M por 1 hora.

Al finalizar las incubaciones, los medio fueron removidos y guardados a -20°C hasta la medición de PRL o LH por RIA. Los cultivos celulares fueron repetidos cuatro veces, y cada vez los grupos experimentales consistieron de 4 pocillos cada uno.

Mediciones de Ca^{2+} intracelular

Los experimentos se realizaron el mismo día de obtención de las células. Se utilizó tetracetoximetilester de FURA-2 (FURA-2/AM) (Sigma) como indicador fluorescente de Ca^{2+} por ser una sonda adecuada para resolver cambios segundo a segundo en los niveles del ión durante la activación de receptores hormonales, según fue demostrado previamente (Anderson et al., 1987). El pellet de células adenohipofisarias fue resuspendido e incubado en una solución salina tamponada (BSS: NaCl 140 mM, KCl 3.9 mM, KH_2PO_4 0.7 mM, Hepes 20 mM, pH 7.5) en la presencia de Fura 2/AM 1.5 μM , glucosa 10 mM, BSA 0.1% y de bajas concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} (CaCl_2 1.8 mM, MgCl_2 2 mM) para prevenir la formación de agregados celulares que pueden interferir con la señal de fluorescencia.

Las células fueron incubadas en oscuridad por 30 min. en una estufa a 37°C con una atmósfera de 5 % CO_2 , tiempo durante el cual el FURA-2/AM fue incorporado a las células y convertido posteriormente a FURA-2 al ser clivado por esterazas endógenas, quedando así atrapado en el citoplasma celular (Chamson-Reig et al., 1999). Luego fueron lavadas dos veces en BSS sin Fura 2/AM, para remover del medio el FURA-

2AM no incorporado. En cada oportunidad, la suspensión se centrifugó 10 min. a 1000 rpm, se aspiró el sobrenadante y luego se resuspendió el pellet en BSS. Luego del último lavado, las células fueron llevadas a una densidad de 1.5 a $2 \cdot 10^6$ células/ml de BSS. La fluorescencia fue medida en un espectrofluorómetro (Jasco Corporation, Tokyo) provisto con el accesorio CA-261 para medir Ca^{2+} con agitación continua, termostato ajustado a 37°C y cámara de inyección. Los niveles de Ca^{2+} intracelulares fueron registrados cada segundo por exposición alternativa a dos longitudes de onda de excitación de 340 y 380 nm y la intensidad de la luz de emisión fue medida a 505 nm. De esta manera las intensidades de luz y sus relaciones (F_{340}/F_{380}) fueron registradas. Las células fueron mantenidas en condiciones de esterilidad hasta que fueron transferidas (500 μl de la suspensión celular) a cubas cilíndricas de vidrio, con 1 ml de capacidad, que se colocaron en el porta cubetas del espectrofluorómetro. Las drogas (5 μl) fueron inyectadas en la microcubeta como una solución 100 veces concentrada sin interrumpir el registro. Al final de cada corrida la preparación fue calibrada determinando la fluorescencia máxima inducida por Triton X-100 0.1% ($F_{\text{máx.}}$) y la fluorescencia mínima ($F_{\text{mín.}}$) en presencia del quelante de Ca^{2+} EGTA 6 mM (pH ajustado arriba de 8.3 con Tris-base 1mM). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue calculada de acuerdo con Grynkiewicz y col. (Grynkiewicz et al., 1985) con la ecuación:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times [(F - F_{\text{mín}})/(F_{\text{máx}} - F)] \times (S_{f380} - S_{b380}),$$

donde: $K_d = 224 \text{ nM}$

$F = F_{340}/F_{380}$ (cociente de intensidades de fluorescencia)

$F_{\text{máx}}$ = fluorescencia máxima

$F_{\text{mín}}$ = fluorescencia mínima

S_{f380} = coeficiente de proporcionalidad del compuesto libre a 380nm.

S_{b380} = coeficiente de proporcionalidad del compuesto unido a 380nm.

No hubo una reducción significativa de la señal del indicador durante el curso del experimento según el análisis de breves registros de la emisión de FURA-2 en respuesta a una excitación, al comienzo y al fin del experimento, con una longitud de onda de 360nm (a la cual la fluorescencia es independiente de $[Ca^{2+}]_i$). La intensidad de fluorescencia de FURA-2 se corrigió respecto a la autofluorescencia de las células (<10% de la fluorescencia de FURA-2 en células no estimuladas) y a la correspondiente al Tritón X-100 cuando fue apropiado. Los gráficos resultantes fueron digitalizados y posteriormente vectorizados y cuantificados usando el programa Ungraph 2.0. Los resultados fueron procesados en Excel 97.

Al principio de cada ensayo, antes del agregado de los estímulos, se aplicó un volumen del diluyente de los mismos (*buffer*) para evaluar los posibles artefactos durante la inyección. La estabilidad de la línea de base fue monitoreada durante estos 2 min. iniciales; posteriormente se administraron los estímulos para estudiar sus efectos sobre la movilización del Ca^{2+} intracelular. Los valores basales (en nM) fueron considerados como aquellos medidos durante los 30 segundos previos a la adición de una cierta droga, a menos que se especifique lo contrario. Para el estudio de la participación de canales de calcio dependientes de voltaje (VSCC), utilizamos bloqueantes específicos de este subtipo de canal. Cuando se realizaron pretratamientos con bloqueantes de VSCC tipo L (verapamil, nifedipina), los mismos se agregaron 1 minuto antes del estímulo correspondiente.

En el caso de los experimentos de Ca^{2+} con células pretratadas con PTX, las células fueron incubadas en placas de 6 pocillos (2.10^6 células/2ml) por 3 días como lo descrito anteriormente, luego fueron incubadas con o sin PTX (150 ng/ml) por 24 horas y levantadas con Accutase (PAA Laboratories GmbH, 1 ml/pocillo), lavadas en BSS e incubadas con Fura 2/AM 1.5 μ M por 30 min. como lo descrito anteriormente.

La normalización en % (porcentaje) de los niveles de calcio fue hecha sobre los niveles de calcio citosólico libre calculados por la fórmula de Grynkiewicz. Los experimentos fueron repetidos 3-7 veces.

Se representa el aumento porcentual inducido por los distintos estímulos luego de normalizarlo respecto del promedio de los valores basales.

Determinaciones de PRL y LH en el medio

PRL y LH fueron determinadas por RIA como en los capítulos anteriores.

Mediciones del cAMP intracelular por RIA

Las células adenohipofisarias fueron plaqueadas en placas p-24 (300.000 células/pocillo) con medio Dulbecco. Después de 3 días en cultivo, las células fueron incubadas por 20-24 horas en la presencia o ausencia de PTX (150 ng/ml) y luego lavadas 2 veces con medio 199. Las células fueron preincubadas por 90 min. con *L*-Baclofen ($1 \cdot 10^{-4}$ M) o 2-hidroxisaclofen ($1 \cdot 10^{-4}$ M), un antagonista GABA_B. Luego se agregó forskolina 0.5 o 5 μ M a los pocillos correspondientes y las células fueron incubadas por 30 min. más. Las incubaciones fueron realizadas en la presencia de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX: 0.1 mM) para inhibir la degradación por las fosfodiesterasas del AMPc formado. Luego de las incubaciones, las células fueron colocadas sobre hielo, se recolectó el medio de incubación y las células fueron lavadas con medio 199 conteniendo BSA 0.1%. Seguidamente, a cada pocillo se le agregó 0.7 ml de etanol frío, las células fueron levantadas y transferidas a tubos Eppendorf, calentados por 5 min. a 95 °C y centrifugados a 10.000 rpm. Los sobrenadantes fueron trasvasados a tubos de plástico, evaporados en un baño a 50°C con flujo de aire y los residuos secos fueron guardados a -20°C hasta la cuantificación de AMPc. Finalmente

estos residuos fueron resuspendidos en 120 µl de *buffer* acetato de sodio 50 mM, pH: 6.2 (*buffer* RIA AMPc). El AMPc intracelular fue medido como en trabajos previos (del Punta et al., 1996) por RIA según el método de Steiner y col, basado en el desplazamiento competitivo de un derivado de AMPc marcado con $^{125}\text{I}_2$, capaz de unirse a un anticuerpo preparado contra succinil AMPc conjugado con albúmina provisto por NIDDKD. Se tomaron 15 µl de muestra por duplicado y se llevaron a 100 µl con *buffer* RIA AMPc. Para aumentar la sensibilidad del radioinmunoensayo, las alícuotas así como la curva patrón se acetilaron con 10 µl de una mezcla de anhídrido acético-trietilamina (1:2 v/v). Se agitó inmediatamente con *vortex* y se dejó reaccionar 10 min. Luego se agregó secuencialmente 100 µl de ^{125}I -AMPc provisto gentilmente por el Dr. O. Pignataro (aproximadamente 25.000 cpm) y 100 µl del anticuerpo con una dilución inicial de 1:10.500 (dilución final 1:31.500). Las muestras y la curva con el trazador y el anticuerpo se incubaron 24 horas a 4°C. La separación del AMPc libre del unido al anticuerpo se logró por el agregado de 50 µl de BSA 2% (P/V) en *buffer* RIA AMPc, recientemente preparado, y 2 ml de etanol frío. Luego de incubar 30 min. a -20°C se centrifugaron los tubos 10 min. a 3.000 cpm. Finalmente se descartó el sobrenadante por decantación y se leyó la radioactividad en el precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo, en un contador gamma. La curva patrón se extendió de 19.5 a 5.000 fmoles por tubo. La sensibilidad del ensayo fue 280 fmol/300.000 células. Los experimentos se repitieron 4 veces.

Drogas

L-Baclofen: Lioresal, fue donada por Novartis, Buenos Aires. Toxina de Pertussis, DA, cloruro de bario (Ba^{2+}), metoxi-verapamil (VERA), nifedipina (NIFE), Fura-2/AM,

GnRH y cloruro de tetraetilamonio (TEA), fueron comprados a Sigma, St. Louis. MO y el TRH en Peninsula, Calif., USA. Todas las drogas fueron disueltas en *buffer* fosfosalino estéril.

Análisis estadísticos

Los resultados de los niveles de PRL o LH (ng/50.000 células) y de AMPc intracelular (fmol/300.000 células) en los experimentos de cultivos celulares están expresados como promedio $\pm$ ES de 3-4 experimentos. Los datos fueron analizados por análisis de varianza para muestras apareadas, seguido por *test* para comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls. En todos los casos los resultados fueron considerados significativos cuando $p < 0.05$. Los resultados en $[Ca^{2+}]_i$ fueron expresados como el porcentaje de variación sobre los niveles basales (Figura IV.3). Los niveles promedio (en nM) medidos 30 segundos antes del agregado de *buffer*, Baclofen o DA fueron considerados como niveles basales. Para cuantificar diferencias entre grupos (Figura IV.4) se calcularon los niveles promedio entre los min. 1 y 2 (estímulo aplicado al minuto 1: *buffer*, Baclofen o DA). La respuesta promedio al *buffer* fue considerada como el 100%.

En el caso de diferentes pretratamientos (TEA o Ba^{2+} , NIFE o VERA y K^+ , Figuras. IV.5-7), las respuestas a Baclofen o DA fueron relacionadas con los niveles promedio de Ca^{2+} de los respectivos pretratamientos más *buffer*, tomándolos como un 100 %.

En el caso de los picos de TRH, los niveles promedio durante los 30 segundos previos a la aplicación de TRH fueron considerados como 100 % en cada grupo.

Los resultados fueron analizados por análisis de varianza en un sentido para muestras apareadas, seguido por *test* de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls.

Resultados

Efecto de la toxina de Pertussis sobre la inhibición de la secreción de PRL inducida por el Baclofen en células de la pituitaria anterior

Para evaluar si los $RGABA_B$ adenohipofisarios estaban acoplados a proteínas G de la clase i/o utilizamos cultivos de células adenohipofisarias. Cuando las células anterohipofisarias de ratas en proestro fueron incubadas en presencia de Baclofen 1.10^{-5} M, se observó una disminución significativa en la secreción de PRL luego de 3 horas de incubación (Figura IV.1, panel superior izquierdo). El Baclofen también bloqueó la liberación de PRL inducida por TRH. Cuando se agregó PTX (150 ng/ml) al medio de cultivo 20 horas antes del experimento, la acción inhibitoria del Baclofen sobre la secreción basal y estimulada por TRH de PRL fue abolida (Figura IV.1, panel inferior izquierdo). Como un control de inhibición de la secreción PRL se usó DA 1.10^{-8} M. La toxina PTX redujo significativamente la disminución de PRL inducida por DA (Tabla IV.1). Estos resultados sugieren que ambos receptores, $RGABA_B$ y DA, comparten una misma clase de proteína G.

Para evaluar la acción de Baclofen sobre la liberación de LH se utilizaron células adenohipofisarias de ratas hembras de 15 días. En estas células el Baclofen no modificó la secreción basal de LH pero sí inhibió significativamente la secreción de LH inducida por GnRH (Figura IV.1, panel superior derecho). El pretratamiento con PTX revirtió completamente este efecto del Baclofen (Figura IV.1, panel inferior derecho).

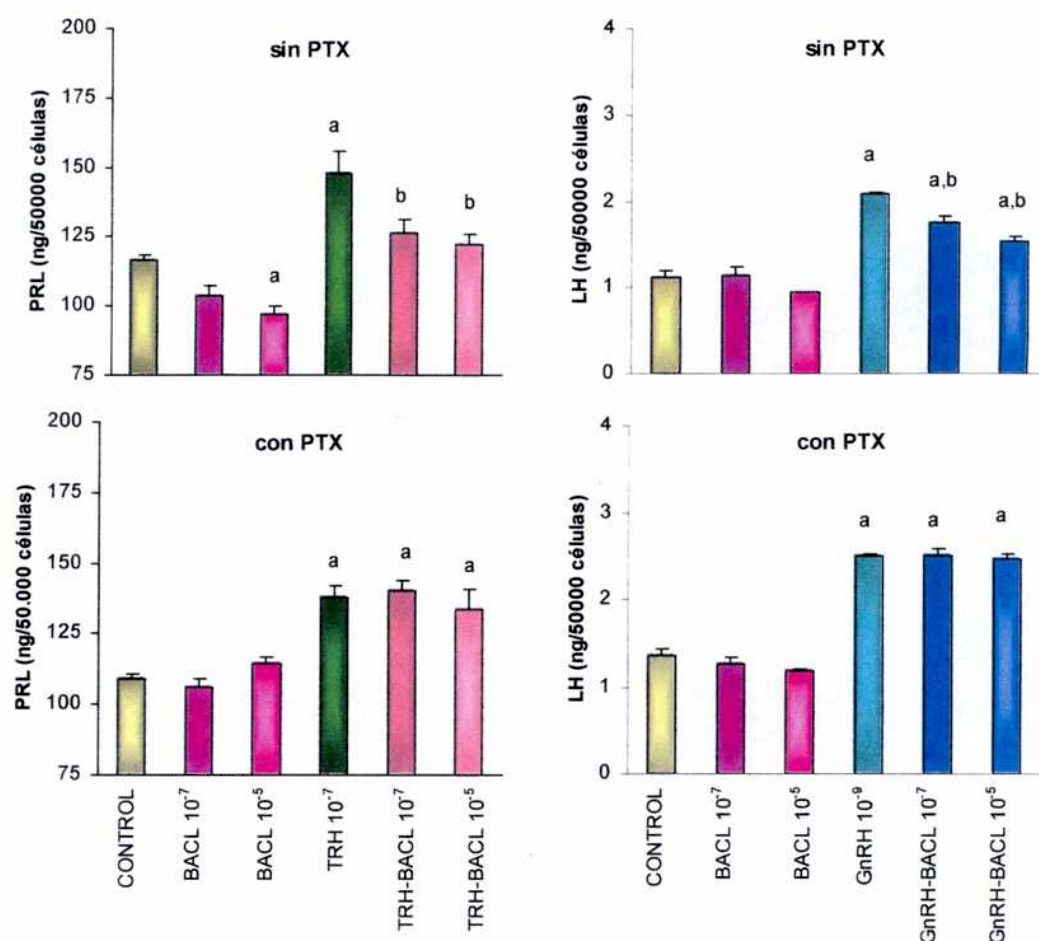


Figura IV.1: Efecto de la Toxina de Pertussis (150 ng/ml, 20 h) sobre la inhibición de la secreción hormonal inducida por Baclofen (BACL) en dos modelos de células adenohipofisarias.

Panel izquierdo: células de ratas en proestro. **Panel derecho:** células de ratas hembras de 15 días. a: significativamente diferente del control. b: significativamente diferente de TRH o GnRH respectivamente. $p < 0.05$. $n = 4$ experimentos.

PRL (%)	Control	DA ($1 \cdot 10^{-8} M$)
Sin PTX	116.4 ± 2.3	36.3 ± 5.3^a
Con PTX	108.9 ± 2.0	$84.3 \pm 7.7^{a,b}$

Tabla IV.1: Efecto de la preincubación con Toxina Pertussis sobre el efecto inhibitorio de la DA sobre la secreción de PRL expresada como % del control, tomando al control como 100%.

(^a) significativamente diferente de los niveles control dentro de un mismo tratamiento (con o sin PTX), (^b) significativamente diferente de DA en las células sin PTX).

Acción del Baclofen sobre el incremento de los niveles intracelulares de AMPc inducido por Forskolina en células de la pituitaria anterior

Para estudiar si los RGABA_B adenohipofisarios modifican la actividad de la adenilil ciclasa, analizamos la acción del Baclofen sobre el aumento de los niveles de AMPc intracelulares inducido por Forskolina en cultivos de células anterohipofisarias de ratas en proestro. Ni el Baclofen, la PTX ni el 2-hidroxisaclofen, antagonista específico de los RGABA_B, afectaron la producción basal de AMPc. La incubación por 30 min. con Forskolina (0.5 μ M) indujo el aumento esperado en la producción de AMPc intracelular.

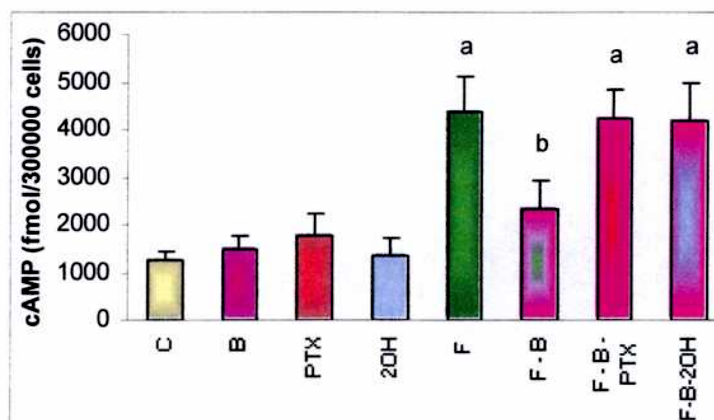


Figura IV.2: Efecto del Baclofen sobre la producción de cAMP inducida por forskolina en células adenohipofisarias de ratas en proestro.

C: control, B: Baclofen 1.10^{-5} M, PTX: Toxina de Pertussis (150 ng/ml, 20 h), 2OH: 2 hidroxisaclophen 1.10^{-4} M, F: forskolina 0.5 μ M. a: significativamente diferente de los valores controles, b: significativamente diferente de, F-B-PTX y F-B-2HO. n= 4 experimentos.

El Baclofen (1.10^{-5} M) redujo significativamente el aumento de este segundo mensajero inducido por Forskolina. El efecto del Baclofen fue revertido por: 2-hidroxisaclofen (1.10^{-4} M), un antagonista específico de los RGABA_B, y por PTX, un inhibidor de las proteínas G_{i/o} (Figura IV.2). Resultados similares fueron obtenidos en presencia de una concentración mayor de Forskolina (5 μ M).

Acción del Baclofen sobre los niveles intracelulares de Calcio en las células de la pituitaria anterior

Luego investigamos si la activación de los $RGABA_B$ en las células adenohipofisarias alteraba los niveles de Ca^{2+} intracelular. El nivel basal de Ca^{2+} intracelular en células en proestro fue: 148 ± 7 nM. El Baclofen ($5 \cdot 10^{-5}$ M) indujo una disminución transitoria, significativa en los niveles basales de Ca^{2+} en estas células, volviendo los títulos de Ca^{2+} a los niveles controles luego de 2 min., aún en la presencia continua de Baclofen (Figura IV.3, panel superior izquierdo).

La movilización de Ca^{2+} inducida por TRH ($1 \cdot 10^{-7}$ M) no fue afectada por este tratamiento con Baclofen (Figura IV.3, panel inferior derecho). Además, el Baclofen tampoco modificó la respuesta en forma de *plateau* inducida por TRH relacionada con el influjo de Ca^{2+} [Ca^{2+} (%) entre los min. 3.5 y 4.9: control: 108.4 ± 2.5 vs. BacI: 111.2 ± 1.7 , n.s.].

Como un control inhibitorio utilizamos DA ($5 \cdot 10^{-7}$ M) y observamos que la misma indujo una inhibición fuerte y sostenida de los niveles basales de Ca^{2+} intracelular (Figura IV.3, panel superior derecho). Esta disminución en el Ca^{2+} intracelular basal inducida por DA fue más intensa que la observada con Baclofen ($p < 0.05$) (Figura IV.3, panel inferior izquierdo); permaneciendo la [Ca^{2+}]_i consistentemente baja hasta que se aplicó el estímulo con TRH. En presencia de DA, el aumento de Ca^{2+} inducido por TRH no fue modificado (Figura IV.3, panel inferior derecho).

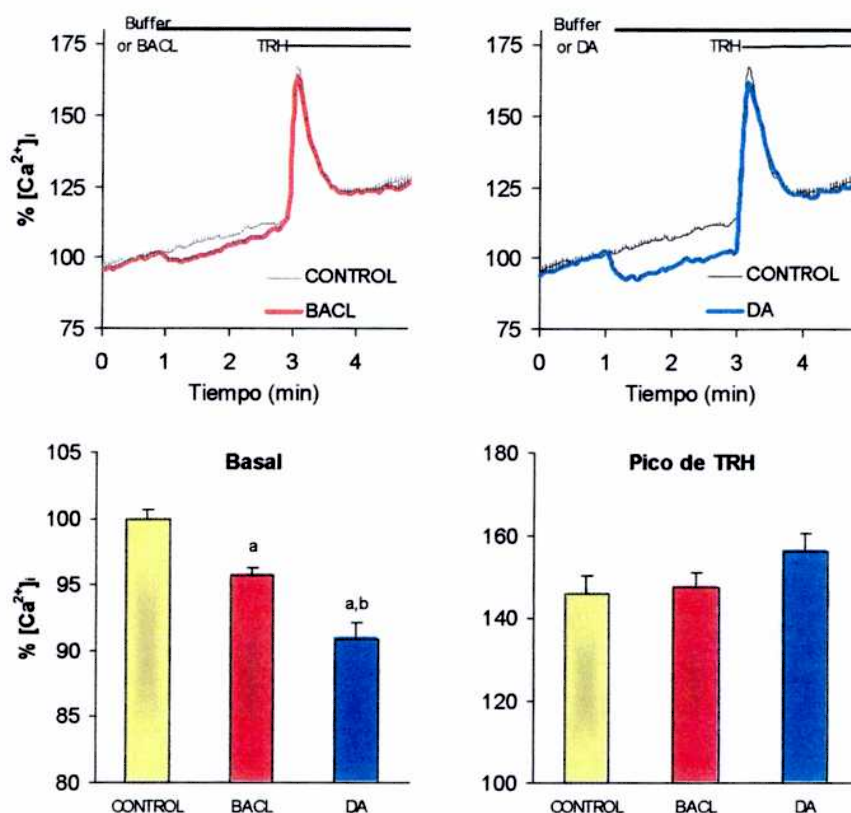


Figura IV.3: Porcentaje de variación de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por BACL ($5 \cdot 10^{-5}M$, min 1, panel superior) o dopamina (DA: $5 \cdot 10^{-6}M$, min 1, panel inferior) y TRH ($1 \cdot 10^{-7}M$, min 3) en células adenohipofisarias de ratas en proestro. Las curvas representan el promedio de 7 experimentos (porcentaje de variación de la $[Ca^{2+}]_i$ con respecto a los niveles basales inmediatamente previos al estímulo con BACL o DA), y las líneas en la parte superior representan el ES para cada punto. Los niveles basales, en nM, fueron citados en el texto.

El pretratamiento con PTX suprime la inhibición sobre los niveles intracelulares de Calcio inducida por el Baclofen

Cuando las células fueron pretratadas por 24 horas con 150 ng/ml de PTX, el Baclofen ($1 \cdot 10^{-4}M$) ya no fue capaz de alterar la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura IV.4). Por el contrario, estas células fueron aun capaces de responder con un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a TRH, el cual se sabe que estimula a una proteína G del tipo $G_{q/11}$ (no se muestra). Esto refuerza la idea que los agonistas $GABA_B$ ejercen sus efectos a través de una proteína $G_{i/o}$, la cual es inactivada por pretratamiento con PTX. Como era

de esperar, el pretratamiento con PTX suprimió completamente el efecto de $DA\ 1.10^{-6}$ M sobre el influjo de Ca^{2+} (no se muestra).

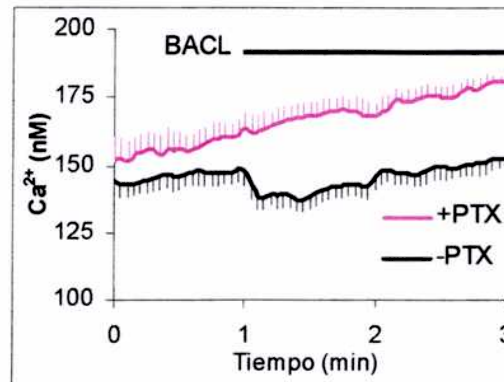


Figura IV.4: El pretratamiento con PTX (150 ng/ml, 24 h) suprimió completamente el efecto del Baclofen (1.10^{-4} M) sobre el influjo de calcio.

El Baclofen se inyecta en el minuto 1 en las células con ambos tipos de pretratamiento. Valores representativos de la $[Ca^{2+}]_i$ (nM): promedio $\pm$ ES de 5 experimentos.

Efecto de los agentes bloqueantes de canales de Potasio sobre la disminución en los niveles de Calcio intracelulares inducida por Baclofen

Luego evaluamos si los $RGABA_B$ adenohipofisarios se acoplaban a canales de K^+ . Para ello agregamos a las células agentes bloqueantes de canales de K^+ , Cloruro de Bario y Tetraetilamonio, antes del estímulo de Baclofen.

El cloruro de bario (Ba^{2+} : 200 μ M o 1 mM) indujo un aumento significativo, dependiente de la concentración, en la $[Ca^{2+}]_i$ basal de 139.2 ± 3.7 nM a un nivel plateau de 163.1 ± 6.1 nM luego de 21 ± 3 s (% de incremento: 16.8 ± 0.5 %) y a 173.6 ± 7.3 nM a 264.9 ± 15.1 nM luego de 18 ± 2 s (% de incremento: 52.1 ± 1.8 %) respectivamente. En cambio el tetraetilamonio (TEA) 10 nM no aumentó significativamente la $[Ca^{2+}]_i$.

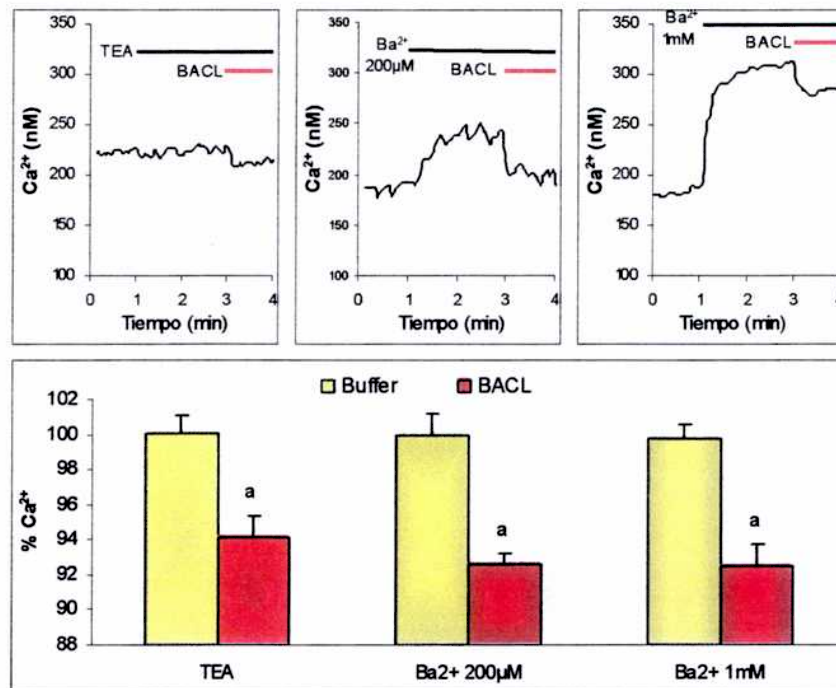


Figura IV. 5: Gráficos representativos del efecto del BACL ($5 \cdot 10^{-5}$ M, min. 3) sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en presencia de los agentes bloqueantes de canales de potasio: tetraetilamonio (TEA: 10 mM, min 1, panel superior izquierdo), $BaCl_2$ (Ba^{2+} : 200 μ M, min 1, panel superior central) o $BaCl_2$ (Ba^{2+} : 1 mM, min 1, panel superior derecho) en células adenohipofisarias de ratas en proestro. **Panel inferior:** porcentaje promedio de la $[Ca^{2+}]_i$ durante los 30 segundos posteriores a la inyección de BACL o *buffer* en células pretratadas con TEA o Ba^{2+} . Tea-*buffer* o Ba^{2+} -*buffer* fueron considerados un 100% de los niveles de calcio. $n = 4$ experimentos. a: significativamente diferente de TEA-*buffer* o Ba^{2+} -*buffer* respectivamente, $p < 0.01$ en ambos casos.

En la presencia de Ba^{2+} o TEA (aplicados 2 min. antes del Baclofen), el Baclofen ($5 \cdot 10^{-5}$ M) fue todavía capaz de disminuir el Ca^{2+} intracelular, $p < 0.01$ (Figura IV.5), indicando que en este efecto no estarían interviniendo los canales de K^+ .

Efecto de inhibidores de Canales de Calcio Sensibles a Voltaje tipo L sobre la disminución del Ca^{2+} intracelular inducida por Baclofen

A continuación estudiamos el efecto de antagonistas de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (VSCC) del tipo L en la acción de los agonistas de los $RGABA_B$ sobre el Ca^{2+}

intracelular. Para ello aplicamos 2 min. antes del Baclofen la fenilalquilamida, metoxiverapamil (VERA: $5 \cdot 10^{-6}$ M) o la dihidropiridina, nifedipina (NIFE: $1 \cdot 10^{-6}$ M). Ambos agentes bloquearon significativamente el influjo de Ca^{2+} resultando en una caída en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 9.7 ± 1.4 % y 12.8 ± 1.9 %, respectivamente. Ambos tratamientos fueron capaces de bloquear completamente la disminución del Ca^{2+} inducida por el Baclofen en estas células (Figura IV.6).

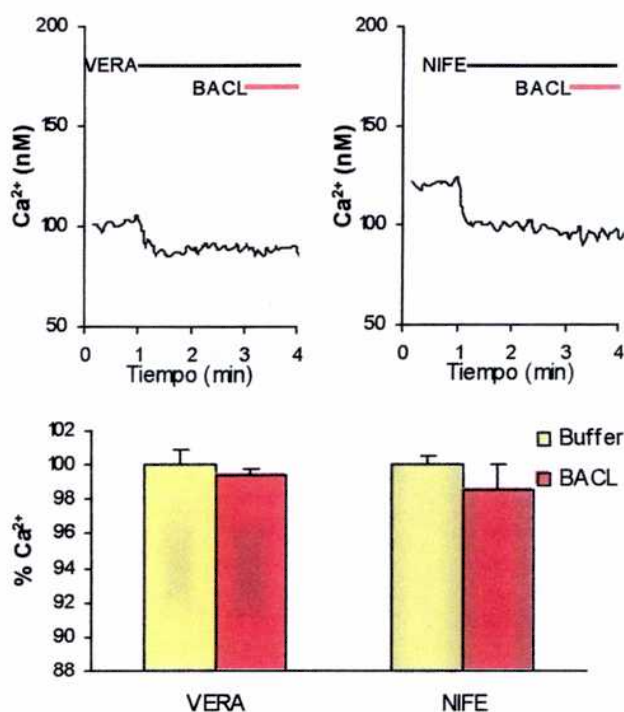


Figura IV.6: Gráfico representativo del efecto del BACL ($5 \cdot 10^{-5}$ M, min 3) sobre el calcio intracelular en presencia de los agentes bloqueantes de VSCC: nifedipina o verapamil (VERA: $5 \cdot 10^{-6}$ M, min 1, panel superior izquierdo) o (NIFE: $1 \cdot 10^{-6}$ M, min 1, panel superior derecho) en células adenohipofisarias de ratas en proestro.

Panel inferior: Porcentaje promedio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante los 30 segundos posteriores a la inyección de BACL o *buffer* en células pretratadas con VERA o NIFE. VERA-*buffer* o NIFE-*buffer* fueron considerados un 100% de los niveles de calcio. $n = 4$ experimentos.

Por el contrario, en presencia de estas drogas, la DA todavía fue capaz de inducir una disminución significativa en el Ca^{2+} intracelular (Figura IV.7).

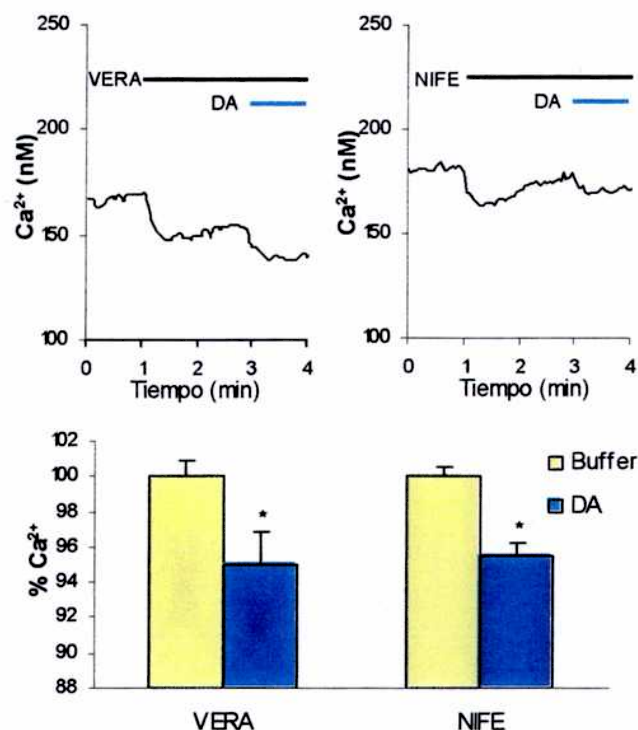


Figura IV.7: Gráfico representativo del efecto de la DA ($5.10^{-6}M$, min 3) sobre el calcio intracelular en presencia de los agentes bloqueantes de VSCC: nifedipina o verapamil (VERA: $5.10^{-6}M$, min 1, panel superior izquierdo) o (NIFE: $1.10^{-6}M$, min 1, panel superior derecho) en células adenohipofisarias de ratas en proestro. Panel inferior: Porcentaje promedio de la $[Ca^{2+}]_i$ durante los 30 segundos posteriores a la inyección de DA o *buffer* en células pretratadas con VERA o NIFE. VERA-*buffer* o NIFE-*buffer* fueron considerados un 100% de los niveles de calcio. $n=4$ experimentos. *: significativamente diferente de VERA-*buffer*, $p<0.05$ o de NIFE-*buffer*, $p<0.01$, respectivamente.

Efecto del Baclofen sobre el incremento en el Calcio intracelular inducido por administración de KCl

Para corroborar que el Baclofen actuaba a través de la inhibición de los VSCC al minuto 1 de corrida agregamos KCL 12.5 mM. Esta concentración de KCl indujo una despolarización débil de las células hipofisarias, ya que por un efecto de masa el K^+ entra a las mismas produciendo un aumento en las cargas positivas intracelulares, disminuyendo así el potencial de membrana, con el aumento esperado en los niveles de Ca^{2+} intracelular como consecuencia de la apertura de los VSCC. El agregado de

Baclofen (1.10^{-4} M) al minuto 4 de corrida disminuyó significativamente la $[Ca^{2+}]_i$ bajo estas condiciones, $p < 0.05$ (Figura IV.8).

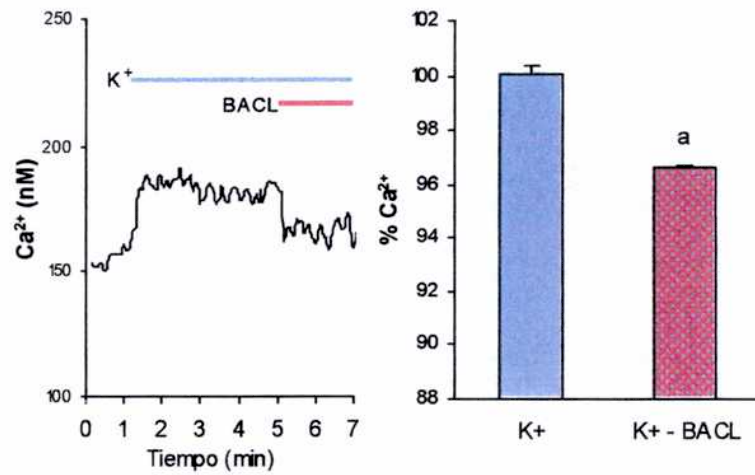


Figura IV.8: Panel izquierdo: gráfico representativo del efecto del BACL (1.10^{-4} M, min 5) sobre la $[Ca^{2+}]_i$ luego de un estímulo despolarizante suave de KCl 12.5 mM aplicado al min 1). Panel derecho: porcentaje promedio de la $[Ca^{2+}]_i$ durante los 30 segundos posteriores a la inyección de BACL en células pretratadas con K⁺. K⁺-buffer fue considerado un 100% de los niveles de calcio. n: 4 experimentos. a: significativamente diferente de K⁺-buffer, $p < 0.01$.

Efecto del pretratamiento con Baclofen sobre la inhibición del influjo de Calcio inducida por Dopamina

Cuando a las células les dimos un estímulo con la máxima concentración de Baclofen (1.10^{-4} M), 2 min. antes de aplicarles DA (1.10^{-6} M), no se bloqueó la caída en los niveles de Ca^{2+} inducida por DA, sugiriendo mecanismos de acción total o parcialmente diferentes en la alteración del influjo de Ca^{2+} para ambas drogas (figura IV.9).

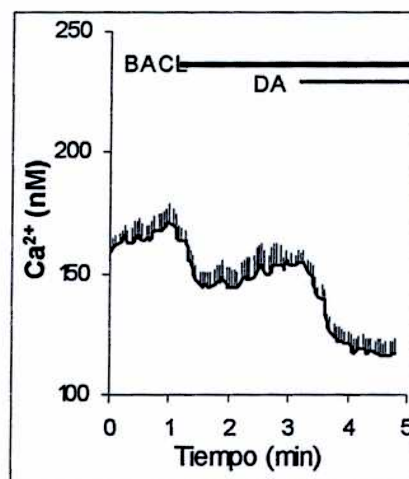


Figura IV.9: Efecto de la DA ($1.10^{-6} M$) sobre el influjo de calcio luego del pretratamiento con BACL ($1.10^{-4} M$) en células adenohipofisarias de ratas en proestro. Los valores representan la $[Ca^{2+}]_i$ (nM) : promedio $\pm$ ES de 5 experimentos.

Discusión

La presencia de RGABA_B en las células de la pituitaria anterior había sido postulada a partir de evidencias obtenidas de distintos tipos de estudios como perfusión de la glándula (Anderson and Mitchell, 1986c), estudios hormonales en cultivos celulares (Lux-Lantos et al., 1992; Rey-Roldán et al., 1996), y más recientemente por estudios de RT-PCR (Mayerhofer et al., 2001; Gamel-Didelon et al., 2002) y nuestros resultados obtenidos con *Western blots* en los capítulos anteriores (Bianchi et al., 2001; Bianchi et al., 2004). Estos receptores fueron descritos en gonadotropos, corticotropos, somatotropos y estarían ausentes en tiotropos (Anderson and Mitchell, 1986c; Tapia-Arancibia et al., 1987; Mayerhofer et al., 2001). Nosotros hemos encontrado evidencias funcionales de su presencia en lactotropos y gonadotropos (Lux-Lantos et al., 1992)]. Los RGABA_B también han sido descrito en melanotropos (Shibuya et al., 1997). En trabajos previos mostramos que la activación de los RGABA_B inhibe la secreción hipofisaria (D'Eramo et al., 1986; Lux-Lantos et al., 1992; Rey-Roldán et al., 1996). Sin embargo, no había disponible información acerca del mecanismo de acción del GABA a través de los RGABA_B en la hipófisis anterior. En consecuencia, el propósito de este capítulo fue determinar las vías de señalización activadas cuando el GABA se unía a su receptor RGABA_B.

Primero quisimos determinar si los RGABA_B adenohipofisarios estaban acoplados a proteínas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G) de la clase i/o, al igual que lo ampliamente reportado en SNC (Kardos et al., 1994; Bowery and Brown, 1997; Bettler et al., 1998). La toxina de Pertussis (PTX) conduce a la ADP-ribosilación de la subunidad α de las proteínas G_i y G_o y al desacople del receptor y la proteína G (Innis et al., 1988). La inhibición de la secreción de PRL y LH se usó como punto final de la

acción del Baclofen sobre las células hipofisarias. El PTX fue capaz de abolir completamente la acción inhibitoria del Baclofen sobre la secreción de PRL basal y la estimulada por TRH en las células provenientes de ratas hembras en proestro. Además, el PTX también revirtió la acción inhibitoria del Baclofen sobre la secreción de LH inducida por GnRH en células adenohipofisarias de ratas hembras de 15 días sugiriendo que los RGABA_B de la hipófisis anterior están acoplados a una proteína G_{i/o}, en concordancia con observaciones en el SNC. El efecto reversivo de PTX sobre la inhibición de PRL inducida por DA fue sólo parcial, como fue previamente demostrado por Musset y col. (Musset et al., 1990).

Similar a lo descripto para DA, se ha mostrado que la activación de los RGABA_B en el sistema nervioso central induce sus efectos por unión a estas proteínas G_{i/o} y evocando varios efectos divergentes como: la apertura de canales de K⁺ adyacentes, la clausura de canales de Ca²⁺ gatillados por voltaje y, usualmente, la inhibición de la adenilil ciclasa (Scott and Dolphin, 1986; Soltesz et al., 1988; Nishikawa and Kuriyama, 1989; Loose et al., 1991; Bowery and Brown, 1997; Bettler et al., 1998).

Si bien trabajamos con una mezcla de poblaciones celulares, en la cual sólo algunos tipos celulares poseen RGABA_B, nuestros resultados muestran claramente que los RGABA_B adenohipofisarios están acoplados negativamente a adenilil ciclasa ya que el Baclofen revirtió significativamente el incremento en AMPc inducido por Forskolina, como fuera descripto en las células HEK293 que expresan de manera estable las subunidades GABA_{B(1a)} (Kaupmann et al., 1997). La acción del Baclofen fue abolida por un antagonista específico, 2 hidroxí saclofen, y por PTX. La reversión por PTX de la caída inducida por Baclofen en los niveles de AMPc estimulado por Forskolina así como también del efecto inhibitorio del Baclofen sobre la secreción de PRL y LH y el

hecho que el pretratamiento con PTX aboliera completamente la acción de este agonista sobre el influjo de Ca^{2+} (ver más adelante) confirma nuevamente el acople de los RGABA_B a proteínas G del tipo $G_{i/o}$ en las células de la pituitaria anterior.

Luego investigamos si la estimulación de los RGABA_B adenohipofisarios modificaba los niveles de calcio intracelulares, un parámetro profundamente relacionado con la secreción hormonal (Stojilkovic et al., 1988), y si estos receptores estaban acoplados a canales de potasio y/o de calcio.

El Baclofen indujo una disminución significativa y transitoria en los niveles de calcio intracelular en las células anterohipofisarias de ratas en proestro. Este efecto del Baclofen concuerda con reportes de *Xenopus* o melanotropos de rata en los cuales los autores describen que el Baclofen no sólo disminuye los niveles de calcio intracelular (Shibuya et al., 1997; Buzzi et al., 1997) sino que esta disminución es transitoria en presencia de la droga (Buzzi et al., 1997). Nuestros resultados con Baclofen sobre los niveles de Ca^{2+} en las células adenohipofisarias difiere de los obtenidos por Horvath et al. (Horváth et al., 1993) o Lorsignol et al (Lorsignol et al., 1994) quienes no encuentran ningún efecto de los agonistas GABA_B sobre este parámetro. Diferencias metodológicas podrían explicar estas discrepancias. Además, hemos encontrado que el modelo experimental condiciona mucho el efecto del Baclofen sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por ejemplo: tratamiento por largo tiempo con E_2 *in vivo* suprime la acción del Baclofen sobre los niveles de Ca^{2+} en las células anterohipofisarias (resultados no publicados). La pequeña disminución en el Ca^{2+} intracelular inducida por Baclofen en comparación con la inducida por DA puede estar relacionada con su baja eficiencia en disminuir la secreción de PRL observada en la figura IV.1 [PRL (% del control): Bac1 1.10^{-5} M: 83

%; DA 1.10^{-8} M: 31 %] indicando un posible rol modulador de los RGABA_B en el control de la secreción de PRL.

Luego intentamos determinar si los RGABA_B adenohipofisarios estaban acoplados a canales de K⁺ como ha sido descrito en SNC, especialmente en las membranas postsinápticas (Innis et al., 1988; Soltesz et al., 1988; Loose et al., 1991). El cloruro de bario (200 μM), bloqueante de canales de K⁺, agregado a las células antes del estímulo con Baclofen, indujo un aumento significativo, dependiente de la concentración, en el calcio intracelular lo que coincide con reportes previos que indican que el Ba²⁺ en estas concentraciones causa despolarización por bloquear la conductancia de K⁺ (Deisz et al., 1997). Al bloquearse los canales de K⁺ este ión no puede salir de la célula, por lo que aumentan las cargas positivas en el interior de la membrana plasmática con la consecuente disminución del potencial de membrana. Esta caída en el potencial de membrana conduce a la apertura de los VSCC aumentando así la concentración de Ca²⁺ en el interior celular. En la presencia de Ba²⁺ el efecto inhibitorio del Baclofen sobre el calcio intracelular estuvo inalterado, indicando que éste era un efecto independiente de la conductancia del K⁺. Resultados similares fueron obtenidos con otro agente bloqueador de canales de K⁺, cloruro de tetraetilamonio. La disminución en la [Ca²⁺]_i inducida por DA fue parcialmente revertida en la presencia de los bloqueantes de canales de K⁺ (resultados no mostrados), de acuerdo con sus acciones postuladas a través de estos canales de K⁺ (Gardette et al., 1994; Wang et al., 1995; Ho et al., 1996).

Como la acción del Baclofen pareció ser un efecto independiente de canales de K⁺, evaluamos el efecto de bloquear canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje (VSCC) del tipo L en la acción de la activación de los RGABA_B sobre el Ca²⁺ intracelular. Ambos antagonistas, verapamil y nifedipina, abolieron completamente la acción depresora del

Baclofen sobre el calcio, sugiriendo que la acción de los agonistas GABA_B estaba mediada por VSCC del tipo L en las células adenohipofisarias. Estos canales VSCC se encuentran activos en la membrana de las células adenohipofisarias y son los responsables de los aumentos en los niveles de Ca²⁺ intracelulares necesarios para la secreción basal de las hormonas hipofisarias. Datos previos del SNC ya habían indicado que el Baclofen podría inhibir corrientes de Ca²⁺ mediante la modulación negativa de algunos canales de Ca²⁺ sensibles a dihidropiridina (tipo L) así como también sensibles a ω -conotoxina GVIA (tipo N) y ω -agatoxina IVA (tipo P) (Scholtz and Miller, 1991; Amico et al., 1995; Huston et al., 1995; Hirata et al., 1995). Más aún, el hecho que el Baclofen fue capaz de inhibir el influjo de Ca²⁺ generado por la despolarización débil con KCl, refuerza la hipótesis que en la pituitaria anterior esta droga actúa cerrando VSCC, probablemente del tipo L. En contraste, la DA indujo una caída significativa en el Ca²⁺ intracelular, aún en la presencia de verapamil o nifedipina, indicando que no actúa solamente por cierre de los VSCC, sino que lo hace principalmente por aumento de la conductancia de K⁺, como ya fuera descripto (Castelletti et al., 1989; Wang et al., 1995; Ho et al., 1996). El hecho que un pretratamiento con una concentración máxima de Baclofen no pudo ocluir la acción de la dopamina también sugiere que ambas drogas estarían usando sistemas efectores diferentes. Así, la hiperpolarización inducida por DA podría clausurar además de los VSCC tipo L, como lo hace el Baclofen, otros VSCC no afectados por este agonista GABA_B en estas células.

En su conjunto estos resultados sugieren que los RGABA_B presentes en las células de la pituitaria anterior, donde participan en la regulación de la secreción adenohipofisaria, son similares a los típicos RGABA_B presinápticos, acoplados negativamente a canales de Ca²⁺ a través de proteínas G sensibles a PTX (Scott and Dolphin, 1986; Alford and Grillner, 1991; Kardos et al., 1994; Obrietan and van den

Pol, 1998). Es interesante notar que en las membranas adenohipofisarias la principal subunidad expresada es la $RGABA_{B(1a)}$, como describimos en el capítulo I, y se ha propuesto que esta subunidad se localiza en SNC principalmente en los sitios presinápticos (Bettler et al., 1998; Billinton et al., 1999), los cuales estarían preferentemente acoplados a canales de calcio.

Estos resultados demuestran que los receptores $RGABA_B$ en la adenohipófisis comparten propiedades funcionales con los receptores del SNC. Tanto la clausura de VSCC como la disminución en la producción de AMPc por Baclofen, podrían estar relacionadas con la inhibición de la liberación hormonal observada en presencia de esta droga.

DISCUSIÓN GENERAL

Los RGABA_B se expresan extensamente en el sistema nervioso, estando involucrados en una gran variedad de desórdenes neurológicos y psiquiátricos como también en problemas de cognición, lo que genera un amplio uso de agonistas y antagonistas de estos receptores en la clínica. A su vez, agonistas de estos receptores son utilizados en tratamientos para combatir la adicción, dado que reducen la avidez a sustancias adictivas. Es más, agonistas, como el gamma hidroxibutirato, están emergiendo como nuevas drogas de abuso. Sin embargo los RGABA_B no son exclusivos del sistema nervioso sino que se encuentran también expresados en otros tejidos como por ejemplo la hipófisis, donde podrían estar modulando, entre otras funciones, la secreción hormonal. No obstante, poco se conocía respecto de las características moleculares ó funcionales de este receptor en la unidad hipotálamo hipofisaria.

En esta tesis nos hemos abocado al estudio del RGABA_B , abordando el tema desde distintas perspectivas.

Por un lado estudiamos la expresión ontogénica del RGABA_B en dos áreas que están directamente involucradas en la fisiología reproductiva, el hipotálamo y la hipófisis anterior, en ratas hembras y machos. Los estudios ontogénicos en la adenohipófisis evaluaron tanto los niveles de expresión proteica de sus subunidades como las características del receptor. Estos resultados mostraron que en ambos sexos hay una disminución tanto en la expresión de las variantes de la subunidad RGABA_{B1} como en el número de sitios de unión GABA_B desde el día 4 de vida hacia la adultez en los animales de ambos sexos. Un patrón similar para $\text{RGABA}_{B(1a)}$ y $\text{RGABA}_{B(1b)}$ fue encontrado en el hipotálamo. Es llamativo que este patrón de expresión también esté presente en otras áreas del cerebro, lo cual podría sugerir que este receptor participa

activamente en mediar respuestas tanto ontogénicas como diferenciadoras del GABA en la rata. Este último punto estaría avalado por las diferencias sexuales encontradas en la intensidad de expresión de las variantes de *splicing* de la subunidad RGABA_{B1} en la pituitaria. Esta diferencia en la expresión del gen del RGABA_B es transitoria y, al igual que sucede para otras características, no puede diferenciarse por sexo en la adultez. La desaparición de esta diferencia sexual podría ser el resultado de la activación de los ovarios. Los ovarios comienzan a ser activos aproximadamente a los 10 días de vida postnatal y si bien esta diferencia en la expresión aún se detecta a los 12 días, se pierde a los 15 días de vida. Es más, observamos diferencias entre las células adenohipofisarias de hembras y machos en cuanto a sus capacidades de respuesta frente al GABA. Esto estaría indicando por un lado un dimorfismo sexual en el control de la secreción adenohipofisaria mediada por esta neurohormona y por otro el papel clave de los esteroides sexuales neonatales en estos eventos.

Una clara expresión sexualmente dimórfica de las subunidades fue determinada durante la ortogenia en la pituitaria anterior. Este evento podría ser estudiado en otras áreas del SNC, en vista a las vastas divergencias de las patologías neurológicas padecidas por machos y hembras.

Es importante señalar que si bien no se observaron diferencias significativas en la expresión de ambas variantes de la subunidad del RGABA_{B1} en el hipotálamo a las edades estudiadas, si se pudo apreciar una tendencia a la inversión en la abundancia relativa de las variantes durante el desarrollo. De esta manera, la variante RGABA_{B(1a)} sería la variante mayoritaria al nacimiento, mientras que la variante RGABA_{B(1b)} lo sería en la adultez, como se ha descripto para otras áreas del SNC. La diferencia sexual temprana observada en la hipófisis está ausente en el hipotálamo. En el hipotálamo se

observa en ratas hembra de 38 días de edad una caída significativa de la variante $RGABA_{B(1a)}$, tanto respecto de $RGABA_{B(1b)}$ en la hembra como de $RGABA_{B(1a)}$ en el macho. A esta edad ocurre la eclosión puberal en las hembras de nuestra colonia, período caracterizado por una marcada modificación en los niveles de GnRH, de las hormonas adenohipofisarias relacionadas con la reproducción y de los esteroides gonadales. Nuevamente, la caída de la expresión de $RGABA_{B(1a)}$ y la eclosión puberal, podrían ser eventos asociados.

Otra diferencia observada entre la adenohipófisis y el hipotálamo fue que en la glándula la subunidad $RGABA_{B2}$ fue prácticamente indetectable en ambos sexos a todas las edades estudiadas, mientras que presentó una franca expresión en el hipotálamo, como fuera descripto. Esto sugiere que en la hipófisis anterior el $RGABA_B$ estaría compuesto por una subunidad $RGABA_{B1}$ asociada a otra/s proteína/s adicional/es necesarias para que el receptor sea funcional.

A su vez, también caracterizamos al $RGABA_B$ adenohipofisario sobre la base de su afinidad por el ligando, número de sitios de unión y al sistema de segundo mensajero al que se encuentra acoplado. Estos receptores presentan varias similitudes con los $RGABA_B$ del SNC. Por un lado, los valores de K_d encontrados son similares a los reportados para el cerebro, los que no variaron significativamente con el sexo o la edad. Por otra parte, estos resultados también demuestran que estos receptores comparten propiedades funcionales con los típicos $RGABA_B$ presinápticos. De esta forma, los $RGABA_B$ presentes en las células de la pituitaria anterior participan en la regulación de la secreción adenohipofisaria modulando negativamente tanto a la adenilil ciclasa como a los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Ambos efectos serían mediados a través de proteínas G sensibles a PTX.

Finalmente, se estudió la regulación de la expresión de RGABA_B en la adenohipófisis en dos situaciones diferentes. Por un lado, en el animal entero donde convergen sobre la adenohipófisis el control hipotalámico directo y el resto de las influencias periféricas y, por otro, en un sistema más controlado, como es un cultivo celular. Los estudios *in vivo* mostraron que la testosterona modula tanto la expresión adenohipofisaria de la subunidad RGABA_{B1} como los niveles de GABA hipotalámicos en estadios tempranos del desarrollo. En los machos la exposición prenatal a andrógenos determina la expresión postnatal de RGABA_{B1} en la adenohipófisis, mientras que en la determinación de los niveles de GABA hipotalámicos intervienen los andrógenos pre y postnatales. En las hembras una exposición neonatal elevada a TP puede disminuir los niveles hipotalámicos de GABA como los niveles adenohipofisarios de RGABA_{B1}. Los resultados *in vitro* aportaron información complementaria al señalar una posible regulación diferencial de la expresión de las subunidades del RGABA_B en la pituitaria anterior. Los esteroides sexuales estimularían la expresión de la subunidad RGABA_{B2} sin modificar a la subunidad RGABA_{B1} en ambos sexos, mientras que el GABA tendría efectos en parte opuestos: aumentaría los niveles de expresión de RGABA_{B1} en hembras, sin alterar a RGABA_{B2}. Por consiguiente se podría postular que *in vivo*, durante el período de diferenciación sexual, las hormonas gonadales disminuirían los niveles de GABA hipotalámico en los machos de manera que esta neurohormona podría alcanzar niveles más altos en la hipófisis anterior de las hembras estimulando la expresión de la subunidad RGABA_{B1} a nivel de mensajero y de proteína. De esta manera se podría justificar la mayor expresión de esta subunidad en las membranas adenohipofisarias de hembras de 8 días. Luego al activarse los ovarios y al apagarse la expresión de la AFP, los niveles de estrógenos séricos aumentan, siendo ahora éstos capaces de actuar directamente en el SNC y disminuir los

niveles de GABA hipotalámicos, disminuyendo por consiguiente la expresión RGABA_{B1} en la glándula. En esta hipótesis debemos tener en cuenta que gran parte de los efectos diferenciadores de los andrógenos son ejercidos luego de su aromatización a estrógenos.

A su vez la expresión sexualmente dimórfica del RGABA_B abre interrogantes sobre si existen determinadas características en las hembras cuya activación depende de este receptor en etapas tempranas del desarrollo y de las que son preservados los machos al tener niveles de expresión inferiores ó, por el contrario, si esta diferencia en la expresión es una mera consecuencia de los niveles de las hormonas gonadales circulantes sin ninguna función asociada.

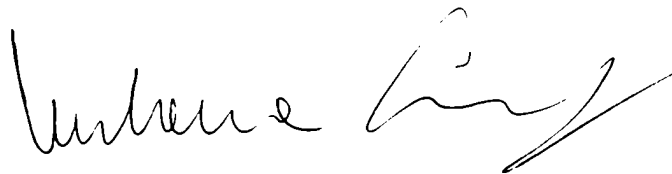
Futuros experimentos tratarán de dilucidar cual es la causa de la respuesta sexualmente diferenciada en la expresión de la subunidad RGABA_{B1} en células hipofisarias en cultivo frente a una estimulación con GABA. También nos proponemos evaluar el papel que desempeña en la hipófisis esta expresión diferencial de los RGABA_B a edades tempranas del desarrollo mediante el uso de ratones *knockout* para la subunidad RGABA_{B1}.

CONCLUSIONES GENERALES

- Por primera vez se caracteriza la expresión de las subunidades del $RGABA_B$ en adenohipófisis e hipotálamo de ratas de ambos sexos y en el desarrollo y en la adultez.
- $RGABA_{B(1a)}$ es la subunidad principalmente expresada a edades tempranas del desarrollo en la pituitaria. En ambos sexos su expresión decrece gradualmente a lo largo del desarrollo postnatal, siendo significativamente más abundante en hembras que en machos a edades tempranas. El hipotálamo muestra un patrón ontogénico similar, sin presentar las diferencias sexuales observadas en la hipófisis.
- $RGABA_{B(1b)}$ es mucho menos abundante que $RGABA_{B(1a)}$ en la hipófisis y también se expresa menos en machos que en hembras a edades tempranas. Sigue un patrón de expresión similar al de $RGABA_{B(1a)}$. En hipotálamo de la rata adulta $RGABA_{B(1b)}$ tiende a ser la principal variante de la subunidad $RGABA_{B1}$.
- La detección de la expresión de $RGABA_{B2}$ en las membranas adenohipofisarias es baja en ambos sexos a las edades estudiadas, a diferencia del hipotálamo donde su expresión es franca y también disminuye durante la ontogenia.
- Los ensayos de radiorreceptor mostraron que el número de $RGABA_B$ disminuye durante la ontogenia en las hembras y que es más abundante en hembras que en machos en edades tempranas del desarrollo, confirmando nuestros resultados de los *Western blots*. Los valores de K_d son similares a los de los $RGABA_B$ presentes en el SNC, no observándose variaciones en dichos valores a lo largo del desarrollo ni entre los sexos.
- Durante la ontogenia en la hipófisis anterior fue determinado un claro dimorfismo sexual en la expresión de las subunidades del $RGABA_B$.

- La testosterona y/o sus metabolitos juegan un papel clave en la modulación de la expresión de la subunidad RGABA_{B1} en la pituitaria durante el desarrollo.
- En esta acción crítica de la testosterona participan ambos picos de androgenización, aunque el intrauterino parece ser el más importante.
- Existe una diferencia sexual en el contenido de los neurotransmisores GABA y glutamato en el hipotálamo siendo mayor en hembras que en machos de 8 días de edad.
- La testosterona, actuando en el período embrionario y neonatal, disminuye los niveles de GABA en el hipotálamo.
- Los niveles de GABA hipotalámico, pero no corticales, correlacionan con la expresión del RGABA_B en la pituitaria.
- La testosterona actúa sobre un área específica: el hipotálamo y sobre un neurotransmisor específico: el GABA. Así este esteroide juega un rol clave tanto en la modulación de la expresión sexualmente dimórfica del RGABA_B en la pituitaria como en los niveles de GABA hipotalámicos en etapas tempranas del desarrollo. Si bien ambos picos de androgenización son importantes en estos eventos, el intrauterino parece ser el más críticamente involucrado.
- Por primera vez se describe que el GABA es capaz de estimular la expresión del ARNm de la subunidad RGABA_{B1} a través de los RGABA_A y RGABA_B, en cultivos de células hipofisarias. Esta capacidad moduladora sólo se observa en células de la hipófisis anterior de hembras, demostrando una clara diferencia sexual en este efecto, sumándose a las diferencias sexuales que se observan en otros aspectos de este sistema.

- Los andrógenos, por su lado, inducen la expresión de $\text{RGABA}_{\text{B}2}$ en células hipofisarias de ambos sexos, efecto que es revertido por el antagonista androgénico Flutamida. Por lo tanto se demuestran regulaciones diferenciales para las dos subunidades del RGABA_{B} .
- Los RGABA_{B} en la hipófisis anterior comparten propiedades funcionales con los receptores del SNC. Estos receptores participan en la regulación de la secreción anterohipofisaria ejerciendo un efecto inhibitorio directo sobre la secreción de PRL y LH, ya a partir de edades muy tempranas del desarrollo.
- Los RGABA_{B} están acoplados negativamente a la adenilil ciclasa y a canales de calcio sensibles a voltaje (VSCC), probablemente del tipo L, a través de proteínas G del tipo $G_{i/o}$ (sensibles a la toxina de Pertussis) en la hipófisis anterior.
- Tanto el cierre de los VSCC como la disminución de la producción de AMP_c promovido por la activación de los RGABA_{B} , podrían estar relacionados con la inhibición de la liberación hormonal observada en presencia de agonistas específicos.

BIBLIOGRAFÍA

Adler,B.A. & Crowley,W.R. (1986) Evidence for Aminobutyric acid modulation of ovarian hormonal effects on luteinizing hormone secretion and hypothalamic catecholamine activity in female rats. *Endocrinology*, **118**, 91-97.

al Dahan,M.I., Jalilian Tehrani,M.H. & Thalmann,R.H. (1994) Regulation of gamma-aminobutyric acidB (GABAB) receptors in cerebral cortex during the estrous cycle. *Brain Res.*, **640**, 33-39.

al Dahan,M.I. & Thalmann,R.H. (1996) Progesterone regulates gamma-aminobutyric acid B (GABAB) receptors in the neocortex of female rats. *Brain Res.*, **727**, 40-48.

Alford,S. & Grillner,S. (1991) The involvement of GABA B receptors and coupled G-proteins in spinal GABAergic presynaptic inhibition. *J.Neurosci.*, **11**, 3718-3726.

Ali,M. & Sahib,M.K. (1983) Changes in alpha-fetoprotein and albumin synthesis rates and their levels during fetal and neonatal development of rat brain. *Brain Res.*, **282**, 314-317.

Amico,C., Marchetti,C., Nobile,M. & Usai,C. (1995) Pharmacological types of calcium channels and their modulation by baclofen in cerebellar granules. *J.Neurosci.*, **15**, 2839-2848.

Anderson,J.M., Yasumoto,T. & Cronin,M.J. (1987) Intracellular free calcium in rat anterior pituitary cells monitored by FURA-2. *Life Sci.*, **41**, 519-526.

Anderson,R. & Mitchell,R. (1986a) Biphasic effect of GABAA receptor agonists on prolactin secretion: evidence for two types of GABAA receptor complex on lactotroprs. *Eur J Pharmacol*, **124**, 1-9.

Anderson,R. & Mitchell,R. (1986b) Distribution of GABA binding sites subtypes in rat pituitary gland. *Brain Res.*, **365**, 78-84.

Anderson,R. & Mitchell,R. (1986c) Effects of gamma-aminobutiric 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.*, **108**, 1-8.

Apud,J.A., Cocchi,D., Locatelli,V., Masotto,C., Muller,E.E. & Racagni,G. (1989) Biochemical and functional aspects on the control of prolactin release by the hypothalamo-pituitary GABAergic system. *Psyconeuroendoc*, **14**, 3-17.

Arbogast,L.A. & Voogt,J.L. (1997) Prolactin (PRL) receptors are colocalized in dopaminergic neurons in fetal hypothalamic cell cultures: effect of PRL on tyrosine hydroxylase activity. *Endocrinology*, **138**, 3016-3023.

Arimura,A. (2004) Hypothalamic Hormones. In Conn,P.M. & Freeman,M.E. (eds), *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Human Press, New Jersey, pp. 41-58.

- Arnold, A. (1984) Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Ann.Rev.Neurosci.*, **7**, 413-442.
- Arrieta, I., Diaz-Ibañez, L.B., Morales, T., Mendoza-Garcés, L., Morimoto, S., Moreno-Mendoza, N. & Cerbon, M.A. (2003) Progesterone receptor gene and protein expression in the anterior preoptic area and hypothalamus of defeminized rats. *J.Neurobiol.*, **56**, 338-346.
- Arvat, E., Giordano, R., Grottoli, S. & Ghigo, E. (2002) Benzodiazepines and anterior pituitary function. *J.Endocrinol.Invest.*, **25**, 735-747.
- Auger, A.P. (2003) Sex differences in the developing brain: crossroads in the phosphorylation of cAMP response element binding protein. *J.Neuroendocrinol.*, **15**, 622-627.
- Auger, A.P., Perrot-Sinal, T.S., Auger, C.J., Ekas, L.A., Tetel, M.J. & McCarthy, M.M. (2002) Expression of the nuclear receptor coactivator, cAMP response element-binding protein, is sexually dimorphic and modulates sexual differentiation of neonatal brain. *Endocrinology*, **143**, 3009-3016.
- Auger, A.P., Perrot-Sinal, T.S. & McCarthy, M.M. (2001) Excitatory versus inhibitory GABA as a divergence point in steroid-mediated sexual differentiation of the brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **98**, 8059-8064.
- Becu-Villalobos, D., Gonzalez Iglesias, A., Díaz-Torga, G., Hockl, P. & Libertun, C. (1997) Brain sexual differentiation and gonadotropins secretion in the rat. *Cell.Mol.Neurobiol.*, **17**, 699-715.
- Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I.M. & Libertun, C. (1989) Developmental changes in FSH secretion induced by 5-hydroxytryptophan, naloxone and haloperidol in male and female rats. *Dev.Brain Res.*, **47**, 181-186.
- Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I.M. & Libertun, C. (1990) Ontogenic studies of the neural control of the adenohipophyseal hormones in the rat: Gonadotropins. *Cell.Mol.Neurobiol.*, **10**, 473-484.
- Becu-Villalobos, D. & Libertun, C. (1986) Ontogenesis of 3(H) serotonin binding sites in the hypothalamus of the female rat: relation to serotonin induced LH release in moxestrol pretreated rats. *Dev.Brain Res.*, **25**, 111-116.
- Becu-Villalobos, D. & Libertun, C. (1995) Development of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) neuron regulation in the female rat. *Cell.Mol.Neurobiol.*, **15**, 165-176.
- Becu-Villalobos, D., Lux, V.A.R., Lacau-Mengido, I.M. & Libertun, C. (1984) Sexual differences in the serotonergic control of prolactin and luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, **115**, 84-89.
- Benke, D., Honer, M., Michel, C., Bettler, B. & Mohler, H. (1999) gamma-aminobutyric acid type B receptor splice variant proteins GBR1a and GBR1b are both associated with

GBR2 in situ and display differential regional and subcellular distribution. *J Biol Chem*, **274**, 27323-27330.

Bettler,B., Kaupmann,K. & Bowery,N.G. (1998) GABA B receptors - drugs meet clones. *Curr. Opin Neurobiol*, **8**, 345-350.

Bettler,B., Kaupmann,K., Mosbacher,J. & Gassmann,M. (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev.*, **84**, 835-867.

Beyer,C. & Feder,H.H. (1987) Sex steroids and afferent input: their roles in brain sexual differentiation. *Annu.Rev.Physiol*, **49**, 349-364.

Bianchi,M.S., Catalano,P.N., Bonaventura,M.M., Silveyra,P., Bettler,B., Libertun,C. & Lux-Lantos,V. (2004) Effect of androgens on sexual differentiation of pituitary GABA B receptor subunit expression. *Neuroendocrinology*, **in press**.

Bianchi,M.S., Rey-Roldán,E.B., Bettler,B., Ristig,D., Malitschek,B., Libertun,C. & Lux-Lantos,V. (2001) Ontogenic expression of anterior pituitary GABA_B receptor subunits. *Neuropharmacol.*, **40**, 185-192.

Billinton,A., Upton,N. & Bowery,N.G. (1999) GABA(B) receptor isoforms GBR1a and GBR1b, appear to be associated with pre- and post-synaptic elements respectively in rat and human cerebellum. *Br J Pharmacol*, **126**, 1387-1392.

Bindokas,V.P. & Ishida,A.T. (1991) (-)-baclofen and gamma-aminobutyric acid inhibit calcium currents in isolated retinal ganglion cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A*, **88**, 10759-10763.

Blein,S., Hawrot,E. & Barlow,P. (2000) The metabotropic GABA receptor: molecular insights and their functional consequences. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **57**, 635-650.

Bormann,J. & Feigenspan,A. (1995) GABAC receptors. *Trends Neurosci.*, **18**, 515-519.

Boue-Grabot,E., Taupignon,A., Tramu,G. & Garret,M. (2000) Molecular and electrophysiological evidence for a GABA_C receptor in thyrotropin-secreting cells. *Endocrinology*, **141**, 1627-1632.

Bowery,N. (1989) GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.*, **10**, 401-407.

Bowery,N.G. (1996) Pharmacology of mammalian GABAB receptors. In Enna,S. & Bowery,N.G. (eds), *The GABA Receptors*. Humana Press Inc, Totowa,NJ, pp. 1-30.

Bowery,N.G. (1999) Metabotropic GABAB receptors. *Neurotransmissions*, **15**, 3-11.

Bowery,N.G., Bettler,B., Froestl,W., Gallagher,J.P., Raiteri,M., Bonner,T.I. & Enna,S.J. (2002) International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -Aminobutyric acid_B receptors: structure and function. *Pharmacol.Rev.*, **54**, 247-264.

Bowery,N.G. & Brown,D. (1997) The cloning of GABA B receptors. *Nature*, **386**, 223-224.

Bowery,N.G., Hill,D.R. & Hudson,A.L. (1985) [3H](-)Baclofen: an improved ligand for GABAB sites. *Neuropharmacol.*, **24**, 207-210.

Brann,D.W., Zamorano,P.L., Putnam-Roberts,C.D. & Mahesh,V.B. (1992) GABA-opioid interactions in the regulation of gonadotropin secretion in the immature female rat. *Neuroendocrinology*, **56**, 445-452.

Brussaard,A.B., Devay,P., Leyting-Vermeulen,J.L. & Kits,K.S. (1999) Changes in properties and neurosteroid regulation of GABAergic synapses in the supraoptic nucleus during the mammalian female reproductive cycle. *J.Physiol.*, **516.2**, 513-524.

Buzzi,M., Bemelmans,F., Roubos,E. & Jenks,B. (1997) Neuroendocrine γ -aminobutyric acid (GABA): functional differences in GABA A versus GABA B receptor inhibition of the melanotrope cell of *Xenopus laevis*. *Endocrinology*, **138**, 203-212.

Carbone,S., Ponzo,O., Szwarcfarb,B., Rondina,D., Reynoso,R., Scacchi,P. & Alberto,M.J. (2002) 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.*, **133**, 13-18.

Carlson,B.X., Elster,L. & Schousboe,A. (1998) Pharmacological and functional implications of developmentally regulated changes in GABA_A receptor subunit expression in the cerebellum. *Eur J Pharmacol*, **352**, 1-14.

Carrer,H.F. & Cambiaso,M.J. (2002) Sexual differentiation of the brain: genes, estrogens, and neurotrophic factors. *Cell.Mol.Neurobiol.*, **22**, 479-500.

Casanueva,F., Apud,J.A., Masotto,C., Cocchi,D., Locatelli,V., Racagni,G. & Muller,E. (1984) Daily fluctuations in the activity of the tuberoinfundibular GABAergic system and plasma prolactin levels. *Neuroendocrinology*, **39**, 367-370.

Castelletti,L., Memo,M., Missale,C., Spano,P. & Valerio,A. (1989) Potassium channels involved in the transduction mechanism of dopamine D2 receptors in rat lactotrophs. *J.Physiol.*, **410**, 251-265.

Casto,J.M., Byron Ward,O. & Bartke,A. (2003) Play, copulation, anatomy, and testosterone in gonadally intact male rats prenatally exposed to flutamide. *Physiology & Behavior*, **79**, 633-641.

Chamson-Reig,A., Pignataro,O.P., Libertun,C. & Lux-Lantos,V. (1999) Alterations in intracellular messengers mobilized by gonadotropin-releasing hormone in an experimental ovarian tumor. *Endocrinology*, **140**, 3573-3580.

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

Cho,B.N. & Kim,K. (1997) Differential effect of baclofen on hypothalamic GnRH and pituitary LH beta gene expression in steroid-treated rats. *Mol Cells*, **7**, 605-609.

Chomczynski,P. & Sacchi,N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**, 156-159.

Clark,J.A., Mezey,E., Lam,A.S. & Bonner,T.I. (2000) Distribution of the GABA(B) receptor subunit gb2 in rat CNS. *Brain Res.*, **860**, 41-52.

Conte,F.A. & Grumbach,M.M. (1991) Abnormalities of sexual differentiation. In Greenspan,F.S. (ed), *Basic and Clinical Endocrinology*. Prentice-Hall international Inc., pp. 518.

Cooke,B., Hegstrom,C.D., Villeneuve,L.S. & Breedlove,S.M. (1998) Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front.Neuroendocrinol.*, **19**, 323-362.

Couve,A., Filippov,A.K., Connolly,C.N., Bettler,B., Brown,D.A. & Moss,S.J. (1998) Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J Biol Chem*, **273**, 26361-26367.

Couve,A., Kittler,J.T., Uren,J.M., Calver,A.R., Pangalos,M.N., Walsh,F.S. & Moss,S.J. (2001) Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. *Mol Cell Neurosci.*, **17**, 317-328.

Crawford,M.L. & Young,J.M. (1988) GABAB receptor-mediated inhibition of histamine H1-receptor-induced inositol phosphate formation in slices of rat cerebral cortex. *J Neurochem.*, **51**, 1441-1447.

Crowley,W.R. & Armstrong,W.E. (1992) Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation. *Endocr.Rev.*, **13**, 33-65.

D'Eramo,J.L., Somoza,G.M., Kertesz,E. & Libertun,C. (1986) Baclofen, a GABA derivative, inhibits stress-induced prolactin release in the rat. *Eur J Pharmacol*, **120**, 81-85.

Dalkin,A.C. & Marshall,J.C. (1997) Reproduction and Fertility. In Conn,P.M. & Melmed,S. (eds), *Endocrinology: Basic and clinical Principles*. Humana Press, New Jersey, pp. 405-418.

Das,S.K. & Ray,P.K. (1996) Ontogeny of GABA pathway in human fetal brain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **28**, 544-548.

Davis,A.M., Grattan,D.R. & McCarthy,M.M. (2000) Decreasing GAD neonatally attenuates steroid-induced sexual differentiation of the rat brain. *Behav.Neurosci.*, **114**, 923-933.

Davis,A.M., Grattan,D.R., Selmanoff,M. & McCarthy,M.M. (1996a) Sex differences in glutamic acid decarboxylase mRNA in neonatal rat brain: implications for sexual differentiation. *Hormones and Behavior*, **30**, 538-552.

- Davis, A.M., Ward, S.C., Selmanoff, M., Herbison, A.E. & McCarthy, M.M. (1999) Developmental sex differences in amino acid neurotransmitter levels in hypothalamic and limbic areas of rat brain. *Neuroscience*, **90**, 1471-1482.
- Davis, E.C., Shryne, J.E. & Gorski, R.A. (1996b) Structural sexual dimorphisms in the anteroventral periventricular nucleus of the rat hypothalamus are sensitive to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally. *Neuroendocrinology*, **63**, 142-148.
- De Robertis, E. (1986) GABAergic Neurotransmission. An Overview. In Racagni, G. & Donoso, A.O. (eds), *GABA and Endocrine Function*. Raven Press, New York.
- De Vries, G.J. (2004) Minireview: Sex differences in adult and developing brains: compensation, compensation, compensation. *Endocrinology*, **145**, 1063-1068.
- Debeljuk, L., Arimura, A. & Schally, A.V. (1972) Studies on the pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in intact male rats at different ages. *Endocrinology*, **90**, 585-589.
- Deisz, R., Billard, J. & Zieglgänsberger, W. (1997) Presynaptic and postsynaptic GABA B receptors of neocortical neurons of the rat in vitro: differences in pharmacology and ionic mechanisms. *Synapse*, **25**, 62-72.
- del Punta, K., Charreau, E. & Pignataro, O.P. (1996) Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology*, **137**, 5337-5343.
- Denef, C. (2003) Paracrine control of lactotrope proliferation and differentiation. *Trends Endocrinol.Metab*, **14**, 188-195.
- Dohler, K.D. (1991) The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. *Int.Rev.Cyt.*, **131**, 1-57.
- Dohler, K.D. & Wuttke, W. (1974) Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology*, **94**, 1003-1008.
- Dohler, K.D. & Wuttke, W. (1975) Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*, **97**, 898-907.
- Donoso, A.O., Seltzer, A.M., Navarro, C.E., Cabrera, R.J., Lopez, F.J. & Negro-Vilar, A. (1994) Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone secretion by hypothalamic amino acids. *Braz.J Med.Biol Res.*, **27**, 921-932.
- Dorner, G. (1981) Sexual differentiation of the brain. *Vitamins and Hormones*, **38**, 325-381.
- Duman, R.S., Karbon, E.W., Harrington, C. & Enna, S.J. (1986) An examination of the involvement of phospholipases A2 and C in the alpha-adrenergic and gamma-aminobutyric acid receptor modulation of cyclic AMP accumulation in rat brain slices. *J Neurochem.*, **47**, 800-810.

- Durkin, M.M., Gunwaldsen, C.A., Borowsky, B., Jones, K.A. & Branchek, T.A. (1999) An in situ hybridization study of the distribution of the GABA(B2) protein mRNA in the rat CNS. *Brain Res. Mol Brain Res.*, **71**, 185-200.
- Duthey, B., Caudron, S., Perroy, J., Bettler, B., Fagni, L., Pin, J.P. & Prezeau, L. (2002) A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA(B) receptor. *J Biol Chem*, **277**, 3236-3241.
- Duvilanski, B.H., Muñoz-Mainez, V., Díaz, M.d.C., Seilicovich, A. & Debeljuk, L. (1984) Serum prolactin levels and GABA-related enzymes in the hypothalamus and anterior pituitary during maturation in the rat. *Neuroendocrinol.Lett.*, **4**, 243-251.
- Duvilanski, B.H., Seilicovich, A., Diaz, M.C., Lasaga, M. & Debeljuk, L. (1986) GABA-prolactin interactions. *Adv.Biochem Psychopharmacol.*, **42**, 119-130.
- Enna, S.J. (2001) A GABA(B) mystery: the search for pharmacologically distinct GABA(B) receptors. *Mol Interv.*, **1**, 208-218.
- Feder, H.H., Phoenix, C.H. & Young, W.C. (1966) Suppression of feminine behaviour by administration of testosterone propionate to neonatal rats. *J Endocrinol.*, **34**, 131-132.
- Fink, G. (1988) Gonadotropin secretion and its control. In Knobil, E. & Neill, J.D. (eds), *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1349-1377.
- Fink, G. (2000) Neuroendocrine regulation of pituitary function. In Conn, P.M. & Freeman, M.E. (eds), *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Humana Press, Totowa NJ, pp. 107-133.
- Fiszer de Plazas, S., Becu, D., Mitridate de Novara, A. & Libertun, C. (1982) GABA receptors in anterior pituitary and brain areas after median eminence lesions. *Endocrinology*, **111**, 1974-1978.
- Fiszer de Plazas, S., Seilicovich, A., Duvilanski, B.H., González, N.N. & Rettori, V. (1983) Sex related differences in GABA binding sites of rat anterior pituitary and hypothalamus. *I.R.C.S.Med.Sci.*, **11**, 976.
- Fitch, R.H., Cowell, P.E., Schrott, L.M. & Denenberg, V.H. (1991) Corpus callosum: perinatal antiandrogen and callosal demasculinization. *Int.J.Devl.Neuroscience*, **9**, 35-38.
- Fitch, R.H. & Denenberg, V.H. (1998) A role for ovarian hormones in sexual differentiation of the brain. *Behavioral And Brain Sciences*, **21**, 311-352.
- Flügge, G., Wuttke, W. & Fuchs, E. (1986) Postnatal development of transmitter systems: sexual differentiation of the Gabaergic system and effects of muscimol. *Int.J.Devl.Neuroscience*, **4**, 319-326.
- Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A. & Nagy, G. (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.*, **80**, 1523-1631.

Fritschy, J. M., Giorgetta, O., and Benke, D. Differential maturation and cellular distribution of the GABAB receptor splice variants in developing brain. GABAB receptors. The 8th Neuropharmacology Conference, Miami, USA. S3-1, 51. 1999a.

Fritschy, J.M., Meskenaite, V., Weinmann, O., Honer, M., Benke, D. & Mohler, H. (1999b) GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur J Neurosci*, **11**, 761-768.

Fritschy, J.M., Paysan, J., Enna, A. & Mohler, H. (1994) Switch in the expression of rat GABAA-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J Neurosci*, **14**, 5302-5324.

Fritschy, J.M., Sidler, C., Parpan, F., Gassmann, M., Kaupmann, K., Bettler, B. & Benke, D. (2004) Independent maturation of the GABA(B) receptor subunits GABA(B1) and GABA(B2) during postnatal development in rodent brain. *J. Comp. Neurol.*, **477**, 235-252.

Fuchs, E., Mansky, T., Stock, K. W., Vijayan, E. & Wuttke, W. (1984) Involvement of catecholamines and glutamate in GABAergic mechanism regulatory to luteinizing hormone and prolactin secretion. *Neuroendocrinology*, **38**, 484-489.

Gage, P. W. (1992) Activation and modulation of neuronal K⁺ channels by GABA. *Trends Neurosci.*, **15**, 46-51.

Galvez, T., Urwyler, S., Prezeau, L., Mosbacher, J., Joly, C., Malitschek, B., Heid, J., Brabet, I., Froestl, W., Bettler, B., Kaupmann, K. & Pin, J. P. (2000) Ca²⁺ requirement for high-affinity gamma-aminobutyric acid (GABA) binding at GABA(B) receptors: involvement of serine 269 of the GABA(B)R1 subunit. *Mol Pharmacol*, **57**, 419-426.

Gamel-Didelon, K., Corsi, C., Pepeu, G., Jung, H., Gratzl, M. & Mayerhofer, A. (2002) An autocrine role for pituitary GABA: activation of GABA-B receptors and regulation of growth hormone levels. *Neuroendocrinology*, **76**, 170-177.

Gamel-Didelon, K., Kunz, L., Föhr, J., Gratzl, M. & Mayerhofer, A. (2003) Molecular and physiological evidence for functional gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptors in growth hormone-secreting cells. *J Biol Chem*, **278**, 20192-20195.

Gardette, R., Rasolonjanahary, R., Kordon, C. & Enjalbert, A. (1994) Epidermal growth factor treatment induces D2 dopamine receptors functionally coupled to delayed outward potassium current (IK) in GH4C1 clonal anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology*, **59**, 10-19.

Gassmann, M., Shaban, H., Vigot, R., Sansig, G., Haller, C., Barbieri, S., Humeau, Y., Schuler, V., Müller, M., Kinzel, B., Klebs, K., Schmutz, M., Froestl, W., Heid, J., Kelly, P. H., Gentry, C., Jaton, A. L., Van der, P. H., Mombereau, C., Lecourtier, L., Mosbacher, J., Cryan, J. F., Fritschy, J. M., Luthi, A., Kaupmann, K. & Bettler, B. (2004) Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice. *J Neurosci.*, **24**, 6086-6097.

- Gladue, B.A. & Clemens, L.G. (1980) Flutamide inhibits testosterone-induced masculine sexual behavior in male and female rats. *Endocrinology*, **106**, 1917-1980.
- Goodarzi, M.O., Dawson, D.W., Li, X., Lei, Z., Shintaku, P., Rao, C.V. & Van Herle, A.J. (2003) Virilization in bilateral macronodular adrenal hyperplasia controlled by luteinizing hormone. *J Clin. Endocrinol. Metab*, **88**, 73-77.
- Gorski, R.A. (1968) Influence of age on the response to paranatal administration of a low dose of androgen. *Endocrinology*, **82**, 1001-1004.
- Gorski, R.A. (2002) Hypothalamic imprinting by gonadal steroid hormones. *Adv Exp Med Biol.*, **511**, 57-70.
- Gorski, R.A., Gordon, J.H., Shryne, J.E. & Southam, A.M. (1978) Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.*, **148**, 333-346.
- Gorski, R.A., Harlan, R.E., Jacobson, C.D., Shryne, J.E. & Southam, A.M. (1980) Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J Comp Neurol.*, **193**, 529-539.
- Grandison, L. (1981) Anterior pituitary GABA receptors and their regulation of prolactin secretion. In Costa, E. & et al. (eds), *GABA and benzodiazepine receptors*. Raven Press, New York, pp. 219-227.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450.
- Gu, G., Cornea, A. & Simerly, R.B. (2003) Sexual differentiation of projections from the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis. *J Comp Neurol*, **460**, 542-462.
- Halasz, B. (2000) The Hypothalamus as an Endocrine Organ: The Science of Neuroendocrinology. In Conn, P.M. & Freeman, M.E. (eds), *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Humana Press, New Jersey, pp. 3-21.
- Han, T.M. & De Vries, G.J. (2003) Organizational effects of testosterone, estradiol, and dihydrotestosterone on vasopressin mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Neurobiol.*, **54**, 502-510.
- Hill, D.R. (1985) GABA_B receptor modulation of adenylate cyclase activity in rat brain slices. *Br. J Pharmacol*, **84**, 249-257.
- Hill, D.R. & Bowery, N.G. (1981) 3H-baclofen and 3H-GABA binding to bicuculline insensitive GABA_B sites in the rat brain. *Nature*, **290**, 149-152.
- Hirata, K., Ohno-Shosaku, T., Sawada, S. & Yamamoto, C. (1995) Baclofen inhibits GABAergic transmission after treatment with type-specific calcium channels blockers in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*, **187**, 205-208.
- Ho, M., Kao, J. & Gregerson, K. (1996) Dopamine withdrawal elicits prolonged calcium rise to support prolactin rebound release. *Endocrinology*, **137**, 3513-3521.

- Hopkins, C.R. & Gregory, H. (1977) Topographical localization of the receptors for luteinizing hormone-releasing hormone on the surface of dissociated pituitary cells. *J. Cell Biol.*, **75**, 528-540.
- Horváth, G., Ács, Z., Mergl, Z., Nagy, I. & Makara, G.B. (1993) Gamma-aminobutyric acid-induced elevation of intracellular calcium concentration in pituitary cells of neonatal rats. *Neuroendocrinology*, **57**, 1028-1034.
- Huston, E., Cullen, G., Burley, J. & Dolphin, A. (1995) The involvement of multiple calcium channel sub-types in glutamate release from cerebellar granule cells and its modulation by GABA B receptor activation. *Neuroscience*, **68**, 465-478.
- Innis, R., Nestler, E. & Aghajanian, G. (1988) Evidence for G protein mediation of serotonin- and GABA B-induced hyperpolarization of rat dorsal raphe neurons. *Brain Res.*, **459**, 27-36.
- Isomoto, S., Kibara, M., Sakurai-Yamashita, Y., Nagayama, Y., Uezono, Y., Yano, K. & Taniyama, K. (1998) Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABAB receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **253**, 10-15.
- Ito, S., Murakami, S., Yamanouchi, K. & Arai, Y. (1986) Prenatal androgen exposure, preoptic area and reproductive functions in the female rat. *Brain Dev.*, **4**, 463-468.
- Jacobson, C.D., Csernus, V.J., Shryne, J.E. & Gorski, R.A. (1981) The influence of gonadectomy, androgen exposure, or a gonadal graft in the neonatal rat on the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *J. Neurosci.*, **1**, 1142-1147.
- Jakubowski, M., Blum, M. & Roberts, J.L. (1991) Postnatal development of gonadotropin-releasing hormone and cyclophilin gene expression in the female and male rat brain. *Endocrinology*, **128**, 2702-2708.
- Johnston, G.A. (1996a) GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther.*, **69**, 173-198.
- Johnston, G.A. (1996b) GABA_A receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci.*, **17**, 319-323.
- Jones, K.A., Borowsky, B., Tamm, J.A., Craig, D.A., Durkin, M.M., Dai, M., Yao, W.J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.-Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J.A., Morse, K., Laz, T., Smith, K.E., Nagarathnam, D., Noble, S.A., Branchek, T.A. & Gerald, C. (1998) GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nature*, **396**, 674-769.
- Jordan, B.A. & Devi, L.A. (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, **399**, 697-700.
- Jost, A., Vigier, B., Prepin, J. & Perchellet, J.P. (1973) Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog. Horm. Res.*, **29**, 1-4.
- Jussolie, A. (1995) Steroid modulation of central nervous GABAA receptor binding in three female rat brain areas during postnatal development. *Dev Neurosci*, **17**, 335-342.

- Kardos, J., Elster, L., Damgaard, I., Krogsgaard-Larsen, P. & Schouboe, A. (1994) Role of GABA B receptors in intracellular Ca^{2+} homeostasis and possible interaction between GABA A and GABA B receptors in regulation of transmitter release in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.*, **39**, 646-655.
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P., Bischoff, S., Mickel, S., 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.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, B., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A. & Bettler, B. (1998) GABA B receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*, **396**, 683-687.
- Kelly, M.J., Loose, M.D. & Ronnekleiv, O.K. (1992) Estrogen suppresses mu-opioid- and GABAB-mediated hyperpolarization of hypothalamic arcuate neurons. *J. Neurosci.*, **12**, 2745-2750.
- Kelly, M.J. & Wagner, E.J. (1999) Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, **10**, 369-374.
- Kim, M.O., Li, S., Park, M.S. & Hornung, J.P. (2003) Early fetal expression of GABA(B1) and GABA(B2) receptor mRNAs on the development of the rat central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **143**, 47-55.
- Kimura, F., Jinnai, K. & Funabashi, T. (1993) A GABA B-receptor mechanism is involved in the prolactin release in both male and female rats. *Neuroscience Letters*, **155**, 183-186.
- Kordon, C., Drouva, S.V., Martinez de la Escalera, G. & Weiner, R.I. (1994) Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. In Knobil, E. & Neill, J.D. (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1621-1681.
- Koreman, S.G., Stevens, R.H., Carpenter, L.A., Robe, M., Niswender, G.D. & Sherman, B.M. (1974) Estradiol, radioimmunoassay without chromatography: procedure, validation and normal values. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **388**, 718-720.
- Kubota, H., Katsurabayashi, S., Moorhouse, A.J., Murakami, N., Koga, H. & Akaike, N. (2003) GABAB receptor transduction mechanisms, and cross-talk between protein kinases A and C, in GABAergic terminals synapsing onto neurons of the rat nucleus basalis of Meynert. *J. Physiol.*, **551**, 263-276.
- Kuner, R., Köhr, G., Grünewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A. & Kornau, H. (1999) Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science*, **283**, 74-77.
- Lacau-Mengido, I.M., Diaz-Torga, G.S. & Libertun, C. (1989) Diazepam: endocrine effects and hypothalamic binding sites in the developing male and female rat. *Life Sci.*, **45**, 567-575.

- Lagrange,A.H., Wagner,E.J., Ronnekleiv,O.K. & Kelly,M.J. (1996) Estrogen rapidly attenuates a GABAB response in hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology*, **64**, 114-123.
- 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.
- Lean,A.D., Ferland,L., Drouin,J., Kelly,P.A. & Labrie,F. (1977) Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinology*, **100**, 1496-1504.
- Lerant,A. & Freeman,M.E. (1998) Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study. *Brain Res.*, **802**, 141-154.
- Leranth,C., MacLusky,N.J., Sakamoto,H., Shanabrough,M. & Naftolin,F. (1985) Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology*, **40**, 536-539.
- Levine,J.E. (2000) The Hypothalamus as a Major Integrating Center. In Conn,P.M. & Freeman,M.E. (eds), *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Humana Press, New Jersey, pp. 75-93.
- Levitt,P. & Rakic,P. (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of developing rhesus monkey brain. *J.Comp.Neurol.*, **193**, 815-840.
- Li,S., Park,M.S. & Kim,M.O. (2004) Prenatal alteration and distribution of the GABA(B1) and GABA(B2) receptor subunit mRNAs during rat central nervous system development. *Brain Res.Dev.Brain Res.*, **150**, 141-150.
- Libertun,C. (1980) *Radioinmunoanálisis* Lopez Libreros, Buenos Aires.
- Libertun,C., Arakelian,M.C., Larrea,G.A. & Foglia,V.C. (1979) Inhibition of prolactin secretion by GABA in female and male rats. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **161**, 28-31.
- Libertun,C. & McCann,S.M. (1976) The effect of aminooxyacetic acid and other amino acids on plasma prolactin in the rat. *I.R.C.S.Med.Sci.*, **4**, 374.
- Lipton,S.A. & Kater,S.B. (1989) Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci.*, **12**, 265-270.
- Locatelli,V., Cocchi,D., Frigerio,C., Betti,R., Krogsgaard-Larsen,P., Racagni,G. & Muller,E.E. (1979) Dual gamma-aminobutyric acid control of prolactin secretion in the rat. *Endocrinology*, **105**, 778-785.
- Loeffler,J.P., Kley,N., Pittius,C.W., Almeida,O.F. & Holtt,V. (1986) In vivo and in vitro studies of GABAergic inhibition of prolactin biosynthesis. *Neuroendocrinology*, **43**, 504-510.

- Loose, M.D., Ronnekleiv, O.K. & Kelly, M.J. (1991) Neurons in the rat arcuate nucleus are hyperpolarized by GABA_B and *u*-opioid receptor agonist: evidence for convergence at a ligand-gated potassium conductance. *Neuroendocrinology*, **54**, 537-544.
- Lorsignol, A., Taupignon, A. & Dufy, B. (1994) Short applications of gamma-aminobutyric acid increase intracellular calcium concentrations in single identified rat lactotrophs. *Neuroendocrinology*, **60**, 389-399.
- Luscher, C., Jan, L.Y., Stoffel, M., Malenka, R.C. & Nicoll, R.A. (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*, **19**, 687-695.
- Luttge, W.G. & Whalen, R.E. (1970) Dihydrotestosterone, androstenedione, testosterone: comparative effectiveness in masculinizing and defeminizing reproductive systems in male and female rats. *Hormones and Behavior*, **1**, 265-281.
- Lux, V.A.R., Somoza, G.M. & Libertun, C. (1986) β -(4-chlorophenyl)GABA (baclofen) inhibits prolactin and thyrotropin release by acting on the rat brain. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **183**, 358-362.
- Lux-Lantos, V., Becu-Villalobos, D., Bianchi, M., Rey-Roldán, E.B., Chamson-Reig, A., Pignataro, O. & Libertun, C. (2001) GABAB receptors in anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology*, **73**, 334-343.
- Lux-Lantos, V.A.R., Rey, E.B. & Libertun, C. (1992) Activation of GABA B receptors in the anterior pituitary inhibits prolactin and luteinizing hormone secretion. *Neuroendocrinology*, **56**, 687-693.
- Ma, W., Saunders, P.A., Somogyi, R., Poulter, M.O. & Barker, J.L. (1993) Ontogeny of GABAA receptor subunit mRNAs in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*, **338**, 337-359.
- Macdonald, R.L. & Olsen, R.W. (1994) GABAA receptor channels. *Annu.Rev.Neurosci.*, **17**, 569-602.
- MacKinnon, P.C.B., Mattock, J. & Ter Haar, M.B. (1976) Serum gonadotropin levels during development in male, female, and androgenized female rats and the effect of general disturbance on high luteinizing hormone levels. *J.Endocrinol.*, **70**, 371.
- MacLennan, A.J., Brecha, N., Khrestchatisky, M., Sternini, C., Tillakaratne, N.J., Chiang, M.Y., Anderson, K., Lai, M. & Tobin, A.J. (1991) Independent cellular and ontogenic expression of mRNAs encoding three alpha polypeptides of the rat GABAA receptor. *Neuroscience*, **43**, 369-380.
- Madtes, P.C. & Redburn, D.A. (1983) Synaptic interactions in the GABA system during postnatal development in retina. *Brain Res.Bull.*, **101**, 741-745.
- Majo, G., Aguado, F., Iasi, J., M & Sal, J. (1998) Synaptobrevin isoforms in secretory granules and synaptic-like microvesicles in anterior pituitary cells. *Life Sci.*, **62**, 607-616.

- Malitschek,B., Rüegg,D., Heid,J., Kaupmann,K., Bittiger,H., Froestl,W., Bettler,B. & Kuhn,R. (1998) Developmental changes of agonist affinity at GABA_BR1 receptor variants in the rat. *Mol.Cell.Neurosci.*, **12**, 56-64.
- Malven,P.V. (2000) Neurotransmitters as Regulators of Hypothalamic Function. In Conn,P.M. & Freeman,M.E. (eds), *The Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Humana Press, New Jersey, pp. 59-73.
- Martin,D.L., Liu,H., Martin,S.B. & Wu,S.J. (2000) Structural features and regulatory properties of the brain glutamate decarboxylases. *Neurochem.Int.*, **37**, 111-119.
- Martin,S.C., Russek,S.J. & Farb,D.H. (1999) Molecular identification of the human GABABR2: cell surface expression and coupling to adenylyl cyclase in the absence of GABABR1. *Mol Cell Neurosci*, **13**, 180-191.
- 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.
- Mayerhofer,A., Höne-Zell,B., Gamel-Didelon,K., Jung,H., Redecker,P., Grube,D., Urbanski,H.F., Gasnier,B., Fritschy,J.M. & Gratzl,M. (2001) Gamma-aminobutyric acid (GABA): a para- and/or autocrine hormone in the pituitary. *FASEB*, **15**, 1089-1091.
- McCarson,K.E. & Enna,S.J. (1999) Nociceptive regulation of GABA(B) receptor gene expression in rat spinal cord. *Neuropharmacol.*, **38**, 1767-1773.
- McCarthy,M.M., Auger,A.P. & Perrot-Sinal,T.S. (2002) Getting excited about GABA and sex differences in the brain. *Trends in Neurosciences*, **25**, 307-312.
- McDonald,P.G. & Doughty,C. (1974) Effect of neonatal administration of different androgens in the female rat: correlation between aromatization and the induction of sterilization. *J.Endocrinol.*, **61**, 95-103.
- McLatchie,L.M., Fraser,N.J., Main,M.J., Wise,A., Brown,J., Thompson,N., Solari,R., Lee,M.G. & Foord,S.M. (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, **393**, 333-339.
- Meier,E., Drejer,J. & Schousboe,A. (1984) GABA induces functionally-active low-affinity GABA receptors on cultured cerebellar granule cells. *J.Neurochem.*, **43**, 1737-1744.
- Moguilevsky,J.A., Carbone,S. & Szwarcfarb,B. (1992) Changes in the Effect of gamma-Aminobutyric Acid on Prolactin secretion during Sexual Maturation in Female Rats. *Endocrinology*, **131**, 458-462.
- Moguilevsky,J.A. & Wuttke,W. (2001) Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*, **109**, 188-195.

- Mohler, H. & Fritschy, J.M. (1999) GABAB receptors make it to the top--as dimers. *Trends Pharmacol.Sci.*, **20**, 87-89.
- Morris, S.J., Davis, T.D., Wolfe, S.E., Beatty, D.M., Enna, S.J., Low, M.J. & Chronwall, B.M. (1999) A murine melanocyte-derived cell line expressing endogenous GABAB receptors. *GABAB receptors. The 8th Neuropharmacology Conference, Miami, USA.*, **P11**, 95.
- Murray, H.E., Rantle, C.M., Simonian, S.X., DonCarlos, L.L., Herbison, A.E. & Gillies, G.E. (1999) Sexually dimorphic ontogeny of GABAergic influences on periventricular somatostatin neurons. *Neuroendocrinology*, **70**, 384-391.
- Musset, F., Bertrand, P., Kordon, C. & Enjalbert, A. (1990) Differential coupling with pertussis toxin-sensitive G proteins of dopamine and somatostatin receptors involved in regulation of adenohypophyseal secretion. *Mol Cell Endocrinol*, **73**, 1-10.
- Nehring, R.B., Horikawa, H.P.M., El Far, O., Kneussel, M., Brandstätter, J.H., Stamm, S., Wischmeyer, E., Betz, H. & Karschin, A. (2000) The metabotropic GABA_B receptor directly interacts with the activating transcription factor 4. *J.Biol.Chem.*, **275**, 35185-35191.
- Neill, J.D. (1988) Prolactin secretion and its control. In Knobil, E. & Neill, J.D. (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1379-1390.
- Neri, R., Florance, K., Koziol, P. & Van Cleave, S. (1972) A biological profile of a nonsteroidal antiandrogen, SCH 13521 (4'-Nitro-3'-Trifluoromethylisobutylanilide). *Endocrinology*, **91**, 427-437.
- Ng, G.Y., Clark, J., Coulombe, N., Ethier, N., Hebert, T.E., Sullivan, R., Kargman, S., Chateauneuf, A., Tsukamoto, N., McDonald, T., Whiting, P., Mezey, E., Johnson, M.P., Liu, Q., Kolakowski, L.F.Jr., Evans, J., Bonner, T.I. & O'Neill, G.P. (1999) Identification of a GABAB receptor subunit, gb2, required for functional GABAB receptor activity. *J Biol Chem*, **274**, 7607-7610.
- Nguyen, L., Rigo, J.M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P. & Moonen, G. (2001) Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.*, **305**, 187-202.
- Nikolarakis, K.E., Loeffler, J.P., Almeida, O.F. & Herz, A. (1988) Pre- and postsynaptic actions of GABA on the release of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Brain Res.Bull.*, **21**, 677-683.
- Nishikawa, M. & Kuriyama, K. (1989) Functional coupling of cerebral γ -aminobutyric acid (GABA) B receptor with adenylate cyclase system: effect of phaclofen. *Neurochem Int*, **14**, 85-90.
- Obrietan, K. & van den Pol, A. (1998) GABA B receptor-mediated inhibition of GABA A receptor calcium elevations in developing hypothalamic neurons. *Am J.Physiol.*, **79**, 1360-1370.

- Ojeda, S.R., Jameson, H.E. & Mc Cann, S.M. (1977) Developmental changes in pituitary responsiveness to luteinizing-hormone releasing hormone (LHRH) in the female rat: Ovarian adrenal influences during the infantile period. *Endocrinology*, **100**, 440-451.
- Ojeda, S.R. & Urbanski, H.F. (1994) Puberty in the rat. In Knobil, E. & Neill, J.D. (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd., New York, pp. 363-409.
- Okamoto, T., Sekiyama, N., Otsu, M., Shimada, Y., Sato, A., Nakanishi, S. & Jingami, H. (1998) Expression and purification of the extracellular ligand binding region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J Biol Chem*, **273**, 13089-13096.
- Olpe, H.R., Karlsson, G., Pozza, M.F., Brugger, F., Steinmann, M., van Riezen, H., Fagg, G., Hall, R.G., Froestl, W. & Bittiger, H. (1990) CGP 53348: a centrally active blocker of GABAB receptors. *Eur J Pharmacol*, **187**, 27-38.
- Orikasa, C., Kondo, Y., Hayashi, S., McEwen, B.S. & Sakuma, Y. (2002) Sexually dimorphic expression of estrogen receptor β in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3306-3311.
- Pagano, A., Rovelli, G., Mosbacher, J., Lohmann, T., Duthey, B., Stauffer, D., Ristig, D., Schuler, V., Meigel, I., Lampert, C., Stein, T., Prezeau, L., Blahos, J., Pin, J., Froestl, W., Kuhn, R., Heid, J., Kaupmann, K. & Bettler, B. (2001) C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J Neurosci.*, **21**, 1189-1202.
- Page, R.B. (1988) The Anatomy of the Hypothalamo-Hypophyseal Complex. In Knobil, E. & Neill, J.D. (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1161-1233.
- Palkovits, M. (2000) Micro- and Macroscopic Structure, Innervation and Vasculature of the Hypothalamus. In Conn, P.M. & Freeman, M.E. (eds), *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Humana Press, New Jersey, pp. 23-40.
- Peets, E.A., Faye-Henson, M. & Neri, R. (1974) On the mechanism of the anti-androgenic action of Flutamide (α - α - α -trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide) in the rat. *Endocrinology*, **94**, 532-540.
- Perrot-Sinal, T.S., Auger, A.P. & McCarthy, M.M. (2003) Excitatory actions of GABA in developing brain are mediated by L-type Ca^{2+} channels and dependent on age, sex, and brain region. *Neuroscience*, **116**, 1003.
- Perrot-Sinal, T.S., Davis, A.M. & McCarthy, M.M. (2001) Developmental sex differences in glutamic acid decarboxylase (GAD(65)) and the housekeeping gene, GAPDH. *Brain Res.*, **922**, 201-208.
- Pfaff, T., Malitschek, B., Kaupmann, K., Prézeau, L., Pin, J.-P., Bettler, B. & Karschin, A. (1999) Alternative splicing generates a novel isoform of the rat metabotropic GABA_BR1 receptor. *Eur J Neurosci*, **11**, 2874-2882.

- Phoenix,C.H., Goy,R.W., Gerall,A.A. & Young,W.C. (1959) Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*, **65**, 369-382.
- Princivalle,A., Spreafico,R., Bowery,N. & De Curtis,M. (2000) Layer-specific immunocytochemical localization of GABA(B)R1a and GABA(B)R1b receptors in the rat piriform cortex. *Eur J Neurosci.*, **12**, 1516-1520.
- Princivalle,A.P., Pangalos,M.N., Bowery,N.G. & Spreafico,R. (2001) Distribution of GABA(B(1a)), GABA(B(1b)) and GABA(B2) receptor protein in cerebral cortex and thalamus of adult rats. *Neuroreport*, **12**, 591-595.
- Prosser,H.M., Gill,C.H., Hirst,W.D., Grau,E., Robbins,M., Calver,A., Soffin,E.M., Farmer,C.E., Lanneau,C., Gray,J., Schenck,E., Warmerdam,B.S., Clapham,C., Reavill,C., Rogers,D.C., Stean,T., Upton,N., Humphreys,K., Randall,A., Geppert,M., Davies,C.H. & Pangalos,M.N. (2001) Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in GABA(B1)-deficient mice. *Mol Cell Neurosci.*, **17**, 1059-1070.
- Quadros,P.S., Goldstein,A.Y., De Vries,G.J. & Wagner,C.K. (2002a) Regulation of sex differences in progesterone receptor expression in the medial preoptic nucleus of postnatal rats. *J Neuroendocrinol.*, **14**, 761-767.
- Quadros,P.S., Pfau,J.L., Goldstein,A.Y., De Vries,G.J. & Wagner,C.K. (2002b) Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology*, **143**, 3727-3739.
- Racagni,G., Apud,J.A., Cocchi,D., Locatelli,V., Iuliano,E., Casanueva,F. & Muller,E. (1984) Regulation of PRL secretion during suckling: Involvement of the hypothalamic-pituitary gabaergic system. *J.Endocrinol.Invest.*, **7**, 481-487.
- Rao,C.V., Zhou,X.L. & Lei,Z.M. (2004) Functional Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptors in Human Adrenal Cortical H295R Cells. *Biol Reprod.*, **71**, 579-587.
- Ray,D. & Melmed,S. (1997) Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr.Rev.*, **18**, 206-228.
- Raynaud,J.P., Mercier-Bodard,C. & Baulieu,E.E. (1971) Rat estradiol binding plasma protein (EBP). *Steroids*, **18**, 767-788.
- Resko,J.A., Feder,H.H. & Goy,R.W. (1968) Androgen concentrations in plasma and testis of developing rats. *J.Endocrinol.*, **40**, 485-491.
- Rey-Roldán,E.B., Lux-Lantos,V., Chamson-Reig,A. & Libertun,C. (1997) In vivo interaction of baclofen, TRH and serotonin on PRL and TSH secretion in the developing and adult male and female rats. *Life Sci.*, **61**, 2283-2290.
- Rey-Roldán,E.B., Lux-Lantos,V.A.R., Gonzalez Iglesias,A., Becu-Villalobos,D. & Libertun,C. (1996) Baclofen, a Gamma-aminobutyric acid B agonist, modifies hormonal secretion in pituitary cells from infantile female rats. *Life Sci.*, **58**, 1059-1065.

- Roselli, C.E. & Klosterman, S.A. (1998) Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effects of perinatal steroid exposure. *Endocrinology*, **139**, 3193-3201.
- Roussel, J.P. & Astier, H. (1990) Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in the GABAA potentiation of TRH-induced TSH release. *Eur J Pharmacol*, **190**, 135-145.
- Rudolph, U., Crestani, F. & Mohler, H. (2001) GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci.*, **22**, 188-194.
- Saller, C.F. & Czupryna, M.J. (1989) γ -Aminobutyric acid, glutamate, glycine and taurine analysis using reversed-phase high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection of dansyl chloride derivatives. *Journal of Chromatography*, **487**, 167-172.
- Scholtz, K. & Miller, R. (1991) GABA B receptor-mediated inhibition of Ca^{2+} currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.*, **444**, 669-686.
- Schoubsoe, A. & Redburn, D.A. (1995) Modulatory actions of gamma aminobutyric acid (GABA) on GABA type A receptor subunit expression and function. *J. Neurosci. Res.*, **41**, 1-7.
- Schousboe, A. (1999) Pharmacologic and therapeutic aspects of the developmentally regulated expression of GABA(A) and GABA(B) receptors: cerebellar granule cells as a model system. *Neurochem Int*, **34**, 373-377.
- Schuler, V., Luscher, C., Blanchet, C., Klix, N., Sansig, G., Klebs, K., Schmutz, M., Heid, J., Gentry, C., Urban, L., Fox, A., Spooren, W., Jatou, A.L., Vigouret, J., Pozza, M., Kelly, P.H., Mosbacher, J., Froestl, W., Kaslin, E., Korn, R., Bischoff, S., Kaupmann, K., van der Putten, H. & Bettler, B. (2001) Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron*, **31**, 47-58.
- Schwartz, J. (2000) Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocr. Rev.*, **21**, 488-513.
- Schwartz, J., Van de, P.S., Clarke, I., Rao, A., Ray, D. & Vrana, K. (1998) Paracrine interactions within the pituitary gland. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **839**, 239-243.
- Schwarz, D.A., Barry, G., Eliasof, S.D., Petroski, R.E., Conlon, P.J. & Maki, R.A. (2000) Characterization of γ -aminobutyric acid receptor $\text{GABA}_{\text{B}(1e)}$, a $\text{GABA}_{\text{B}(1)}$ splice variant encoding a truncated receptor. *J Biol Chem*, **275**, 32174-32181.
- Scott, R. & Dolphin, A. (1986) Regulation of calcium currents by a GTP analogue: potentiation of (-)-Baclofen-mediated inhibition. *Neuroscience Letters*, **69**, 59-64.
- Segovia, S., Guillaumon, A., del Cerro, M.C., Ortega, E., Perez-Laso, C., Rodriguez-Zafra, M. & Beyer, C. (1999) The development of brain sex differences: a multisignaling process. *Behav. Brain Res.*, **105**, 69-80.

- Seiler,N. (1980) On the role of GABA in vertebrate polyamine metabolism. *Physiol Chem Phys.*, **12**, 411-429.
- Shank,R.P., Bennett,G.S., Freytag,S.O. & Campbell,G.L. (1985) Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res.*, **329**, 364-367.
- Sheridan,P.J., Zarrow,M.X. & Denenberg,V.H. (1973) Androgenization of the neonatal female rat with very low doses of androgen. *J.Endocrinol.*, **57**, 33-45.
- Shibuya,I., Harayama,N., Sasaki,N., Uezono,Y., Tanaka,K., Ueta,Y. & Yamashita,H. (1999) Distinct cellular mechanisms utilized by GABAB and dopamine D2 receptors in suppressing Ca²⁺ signalling of pituitary melanotrophs. *GABAB receptors. The 8th Neuropharmacology Conference, Miami, USA.*, **P23**, 109.
- Shibuya,I., Kongsamut,S. & Douglas,W. (1997) Both GABA A and GABA B receptors participate in suppression of [Ca²⁺]_i pulsing in toad melanotrophs. *Eur J Pharmacol*, **321**, 241-246.
- Shinohara,K., Nishikawa,T., Ishii,S., Yamazaki,K. & Takahashi,K. (1989) Ontogeny of aminoacids related to excitatory aminoacidergic transmission in the rat forebrain. *Tokai J Exp Clin Med*, **14**, 381-386.
- Silverman,A. & Pickard,G. (1983) The Hypothalamus. In Emson,P. (ed), *Chemical Neuroanatomy*. Raven Press, New York.
- Simeone,T.A., Donevan,S.D. & Rho,J.M. (2003) Molecular biology and ontogeny of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol*, **18**, 39-48.
- Simerly,R.B. (2002) Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu Rev Neurosci.*, **25**, 507-536.
- Sladek,C.D. & Armstrong,W.E. (1987) gamma-Aminobutyric acid antagonists stimulate vasopressin release from organ-cultured hypothalamo-neurohypophyseal explants. *Endocrinology*, **120**, 1576-1580.
- Slesinger,P.A., Stoffel,M., Jan,Y.N. & Jan,L.Y. (1997) Defective gamma-aminobutyric acid type B receptor-activated inwardly rectifying K⁺ currents in cerebellar granule cells isolated from weaver and Girk2 null mutant mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 12210-12217.
- Smith,G.B. & Olsen,R.W. (1995) Functional domains of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci.*, **16**, 162-168.
- Soltesz,I., Haby,M., Leresche,N. & Crunelli,V. (1988) The GABA B antagonist phaclofen inhibits the late K⁺-dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurons. *Brain Res.*, **448**, 351-354.
- Stojilkovic,S.S., Izumi,SI. & Catt,K.J. (1988) Participation of voltage-sensitive calcium channels in pituitary hormone release. *J Biol Chem*, **263**, 13054-13061.

- Suarez,C., García Tornadú,I., Khalil,W. & Becu-Villalobos,D. (2002) Dehydroepiandrosterone treatment attenuates estrogen induced pituitary hyperplasia. *J.Endocrinol.*, **174**, 447-454.
- Takahashi,T., Kajikawa,Y. & Tsujimoto,T. (1998) G-Protein-coupled modulation of presynaptic calcium currents and transmitter release by a GABAB receptor. *J Neurosci.*, **18**, 3138-3146.
- Tapia-Arancibia,L., Roussel,J.P. & Astier,H. (1987) Evidence for a dual effect of γ -aminobutyric acid (GABA) on TSH-releasing hormone-induced TSH release from perfused rat pituitary. *Endocrinology*, **121**, 980.
- Tappaz,M.L. (1984) GABA and anterior pituitary function: anatomical data. *Psyconeuroendoc*, **9**, 85-95.
- Tappaz,M.L., Kakucska,I., Paut,L. & Makara,G.B. (1986) Decreased GABAergic innervation of the pituitary intermediate lobe after rostral hypothalamic cuts. *Brain Res.Bull.*, **17**, 711-716.
- Tobet,S.A. (2002) Genes controlling hypothalamic development and sexual differentiation. *Eur J Neurosci*, **16**, 373-376.
- Tobet,S.A. & Hanna,I.K. (1997) Ontogeny of sex differences in the mammalian hypothalamus and preoptic area. *Cell.Mol.Neurobiol.*, **17**, 565-601.
- Tuomisto,J. & Mannisto,P. (1985) Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol.Rev.*, **37**, 249.
- Turgeon,S.M. & Albin,R.L. (1994) Postnatal ontogeny of GABAB binding in the rat brain. *Neuroscience*, **62**, 601-613.
- Vale,C., Damgaard,I., Suñol,C., Rodriguez-Farré,E. & Schousboe,A. (1998) Cytotoxic action of lindane in cerebellar granule neurons is mediated by interaction with inducible GABA_B receptors. *J.Neurosci.Res.*, **52**, 286-294.
- Van der Schoot,P. (1992) Disturbed testicular descent in the rat after prenatal exposure to the antiandrogen flutamide. *J.Reprod.Fertil.*, **96**, 483-496.
- Vanhose,A.M., Emery,M., Jimenez,L. & Winder,D.G. (2002) ERK activation by G-protein-coupled receptors in mouse brain is receptor identity-specific. *J Biol Chem*, **277**, 9049-9053.
- Varju,P., Katarova,Z., Madarasz,E. & Szabo,G. (2001) GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res.*, **305**, 239-246.
- Verdonck,A., De Ridder,L., Kuhn,R., Darras,V., Carels,C. & de Zegher,F. (1998) Effect of testosterone replacement after neonatal castration on craniofacial growth in rats. *Arch.Oral Biol*, **43**, 551-557.
- Vernon,E., Meyer,G., Pickard,L., Noel,J., Collingridge,G.L. & Henley,J.M. (1999) Identification and characterization of a protein which interacts with the GABABR1

subunit. *GABAB receptors. The 8th Neuropharmacology Conference, Miami, USA.*, S2-1, 45.

Vijayan, E. & McCann, S.M. (1978) The effect of intraventricular injection of gamma-aminobutyric acid (GABA) on prolactin and gonadotropin release in conscious female rats. *Brain Res.*, **155**, 35-43.

Virmani, M.A., Stojilkovic, S.S. & Catt, K.J. (1990) Stimulation of luteinizing hormone release by γ -aminobutyric acid (GABA) agonists: mediation by GABA A-type receptors and activation of chloride and voltage-sensitive calcium channels. *Endocrinology*, **126**, 2499-2505.

Waagepetersen, H.S., Sonnewald, U. & Schousboe, A. (1999) The GABA Paradox: multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *J. Neurochem.*, **73**, 1335-1342.

Wang, X., Sato, N., Greer, M. & Faraldeal, P. (1995) Pituitary PRL secretion induced by tetraethylammonium is inhibited by dopamine through D2 receptors. *Mol Cell Endocrinol*, **112**, 153-157.

Ward, I.L. (1972) Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science.*, **175**, 82-84.

Ward, I.L. (1980) Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science.*, **207**, 328-329.

Wei, K., Eubanks, J.H., Francis, J., Jia, Z. & Snead, O.C., III (2001) Cloning and tissue distribution of a novel isoform of the rat GABA(B)R1 receptor subunit. *Neuroreport*, **12**, 833-837.

Weisz, J. & Ward, I.L. (1980) Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology*, **106**, 306-316.

Weniger, J.P., Zeis, A. & Chouraqui, J. (1993) Estrogen production by fetal and infantile rat ovaries. *Reprod. Nutr. Dev.*, **33**, 129-136.

White, J.H., McIlhinney, R.A.J., Wise, A., Ciruela, F., Chan, W.-Y., Emson, P., Billinton, A. & Marshall, F.H. (2000) The GABA_B receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 13967-13972.

White, J., Wise, A., Main, M., Green, A., Fraser, N., Disney, G., Barnes, A., Emson, P., Foord, S. & Marshall, F. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABAB receptor. *Nature*, **396**, 679-682.

Xu, J. & Wojcik, W.J. (1986) Gamma aminobutyric acid B receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in cultured cerebellar granule cells: blockade by islet-activating protein. *J Pharmacol Exp. Ther.*, **239**, 568-573.