

Tesis Doctoral

GABA y receptores GABA B en el eje reproductivo: su relación con GnRH y kisspeptinas

Di Giorgio, Noelia Paula

2013

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 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:

Di Giorgio, Noelia Paula. (2013). GABA y receptores GABA B en el eje reproductivo: su relación con GnRH y kisspeptinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Di Giorgio, Noelia Paula. "GABA y receptores GABA B en el eje reproductivo: su relación con GnRH y kisspeptinas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

GABA y receptores GABA_B en el eje reproductivo: su relación con GnRH y kisspeptinas

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

LIC. NOELIA PAULA DI GIORGIO

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Victoria Lux-Lantos

DIRECTOR ASISTENTE DE TESIS: Dra. María Silvia Bianchi

CONSEJERO DE ESTUDIOS: Dr. Juan Carlos Calvo

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL (IBYME-CONICET)

BUENOS AIRES, 2013.

GABA y receptores GABA_B en el eje reproductivo: su relación con GnRH y kisspeptinas

RESUMEN

Kisspeptina, GnRH y GABA juegan un papel fundamental en la regulación del eje gonadotrófico, si bien la interacción entre ellos está poco caracterizada. Estudios previos en ratones carentes del RGABA_B funcional (GABA_{B1}KO) sugerían alteraciones reproductivas, principalmente en la hembra.

Nuestra hipótesis fue que GABA, a través de sus RGABA_B, interviene en la regulación de la reproducción impactando sobre los sistemas GnRH/kisspeptina en el cerebro, durante el desarrollo y en la adultez.

Demostramos por primera vez la co-localización del RGABA_{B1} en neuronas *Kiss1* del AVPV/PeN y ARC. La falta de un RGABA_B funcional impacta diferencialmente según la edad evaluada. En ratones de 4 días de edad los cambios se observan en el hipotálamo medio basal, mientras que en ratones adultos aparecen en el hipotálamo anterior. Sin embargo, no se deberían a alteraciones hipotalámicas de *Kiss1* ni a los niveles de esteroides circulantes. Además, los ratones GABA_{B1}KO adultos presentaron un aumento drástico de *Kiss1* en áreas extra hipotalámicas (MeA, BNST y *Septum*) relacionadas con la reproducción y la conducta sexual.

En conclusión, GABA, a través de sus RGABA_B, interactuaría con GnRH y kisspeptina en la regulación del eje gonadotrófico de manera diferencial durante el desarrollo y entre los sexos, alterando la reproducción.

Palabras claves: Receptores GABA_B, Kisspeptinas, GnRH, gonadotropinas, esteroides gonadales, reproducción.

GABA and GABA_B receptors in the reproductive axis: its relationship with GnRH and kisspeptins

ABSTRACT

Kisspeptin, GnRH and GABA play an important role in the control of the gonadotrophic axis, although the interaction between them is not well known. Previous studies in mice which lack of functional GABA_B receptors (GABA_{B1}KO) point to reproductive alterations, mainly in females.

Our hypothesis was that GABA, through GABA_B receptors (GABA_BRs), acts in the regulation of reproduction and impacts on the GnRH/Kisspeptin systems in the brain, along development and in adulthood.

We demonstrated for the first time the co-localization of the *RGABA_{B1}* subunit in AVPV/PeN and ARC *Kiss1* neurons. The lack of functional GABA_BRs impact differentially according to the stage of life evaluated. While at postnatal day 4 we observed changes in the medial basal hypothalamus, in adulthood we found them in the anterior hypothalamus. However, these changes were not due to alterations in hypothalamic *Kiss1* or serum steroid levels. Moreover, adult GABA_{B1}KO mice showed a dramatic increase in *Kiss1* expression in extra-hypothalamic areas (MeA, BNST y *Septum*), which are related to reproduction and sexual behaviour.

In conclusion, GABA, through GABA_BR, interacts with GnRH and kisspeptin in the regulation of the gonadotrophic axis in a different way between sexes and along development. Lack of GABA_BRs impairs normal reproduction in females.

Key words: GABA_B receptors, Kisspeptins, GnRH, gonadotropins, gonadal steroids, reproduction.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis de Doctorado dieron origen hasta hoy a los siguientes trabajos científicos:

2013. *Lack of functional GABA_B receptors alters Kiss1, Gnrh1 and Gad1 mRNA expression in the medial basal hypothalamus at postnatal day 4.* **Di Giorgio NP,** Catalano PN, López PV, González B, Semaan SJ, López GC, Kauffman AS, Rulli SB, Somoza GM, Bettler B, Libertun C, Lux-Lantos VA. **Neuroendocrinology.** En prensa. Aceptado Septiembre 2013.

2013. *Impaired GABA_{B1} receptor signaling dramatically upregulates Kiss1 expression selectively in non-hypothalamic brain regions of mice.* **Di Giorgio NP,** Semaan SJ, Kim J, López PV, Bettler B, Libertun C, Lux-Lantos VA, Kauffman AS. **Endocrinology.** En revisión.

2010. *Lack of functional GABA_B receptors alters GnRH physiology and sexual dimorphic expression of GnRH and GAD-67 in the brain.* Catalano PN, **Di Giorgio N,** Bonaventura MM, Bettler B, Libertun C, Lux-Lantos VA. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2010 Mar;298(3):E683-96. Epub 2009 Dec 15.

AGRADECIMIENTOS

Realizar, escribir y defender la Tesis de Doctorado para obtener el título de Doctor puede parecer algo sencillo (para quienes lo ven desde afuera) que queda resumido en estas doscientas y tantas páginas. Sin embargo, es un laaaaargo camino de esfuerzo, dedicación, alegrías, desánimos, sacrificio, recompensas y por sobre todo, mucha tolerancia al estrés (cosa que aún no logré aprender). Por suerte, este camino uno no lo recorre solo, sino que alrededor se encuentran muchas personitas que te guían, contienen, enseñan, alegran, dan ánimo, alientan, escuchan, comparten y hacen que el camino sea muchísimo más llevadero y ameno de lo que sería transitarlo en soledad. Por eso hoy quiero agradecerle a cada uno que hiciera posible de alguna u otra manera que llegue a lograr esta nueva meta en mi vida.

En primer lugar quiero agradecer a todos mis compañeros actuales de laboratorio, aquellos que han compartido mucho tiempo con nosotros y ahora han tomado nuevos rumbos y a muchos otros que me ayudaron laboralmente a lo largo de este tiempo. Gracias a todos por fomentar que el lugar de trabajo sea un lugar ameno en donde uno pueda desarrollarse profesional y humanamente de la mejor manera posible.

A **Vicky**, mi Directora de Tesis, pero mucho más que eso. Quiero agradecerte por ser la persona que guió, desde mis inicios en el laboratorio, mi camino en esto que me apasiona que es investigar. Gracias por enriquecerme con todos tus conocimientos, por fomentar mi curiosidad, mis ganas de aprender y de hacer cosas nuevas. Gracias por estar dispuesta SIEMPRE a analizar y discutir resultados (relojeando los gráficos desde tu compu, transmitiendo por ósmosis tu ansiedad y tus ganas de saber cómo dió), a organizar y planificar el avance de los experimentos y los nuevos emprendimientos. Pero por sobre todo, quiero agradecerte porque si bien estuviste detrás en cada pequeño detalle para lo que necesité, también me diste la libertad y la confianza para emprender nuevas cosas y me alentaste en cada proyecto que emprendí a lo largo de estos años. Por otro lado, también quiero agradecerte porque no sólo cumplís el rol de Directora sino también sos un poco la “madre científica” de todos los que trabajamos con vos y siempre te interesas por saber cómo está uno fuera del laboratorio, te alegrás con nosotros en los buenos momentos y nos acompañás en nuestras tristezas.

A **Sil**, mi Directora Asistente y mi fiel compañera de mates. Gracias por tu predisposición para todo lo que necesito y por tu ayuda a discutir resultados, enseñanza de técnicas o consejos útiles, por tu aliento, tus “sí se puede”, por las charlas y momentos compartidos, por tus célebres frases como “si querés ser tan Papista como el Papa...”. Gracias por estar siempre dispuesta a escuchar y acompañarme en los momentos en dónde uno quiere dejar todo y dedicarse a otra cosa, gracias por pertenecer a este gran grupo de auto ayuda que tiene reuniones prácticamente todos los meses, porque en esos momentos por suerte hay gente como vos que te alientan a seguir adelante superando las dificultades. Te doy las gracias por todo eso y te pido perdón por las veces que te entregué el mate frío y lavado, había que trabajar, ¡la tesis no se hace sola desafortunadamente!.

Al **Dr. Libertun** o “Jefe” como lo llamamos nosotros. Gracias por el lugar que me brindó en el laboratorio y por confiar en mí desde que era estudiante para empezar este largo camino.

A **Nanu**, la personita con la que más me identifico. Gracias por ser así como sos, por tus valores, tu exigencia, tu sinceridad (¡y tus caras!), tu aliento, tu ayuda, tu desinterés y tus ganas de luchar por lo mejor, lo correcto y lo justo siempre. A lo largo de estos años fui conociéndote cada vez más y siento que no sólo tengo una gran compañera en el laburo sino que también gané una gran amiga. Gracias por todas las charlas, chats, mails y las veces que me aguantaste con mis locuras, mi estrés y que compartiste mis alegrías y tristezas. Sos una gran persona y espero que, aunque no sepamos que nos depara el destino, no perdamos esta amistad, ¡te quiero mucho!

A **María, Martin y Pau**, quienes compartieron conmigo la enorme tarea de trabajar con ratones KO, con TODO lo que eso implica. Con dificultades y piedras en el camino, siempre logramos que la colonia avance y podamos terminar nuestras tesis. Gracias por toda la ayuda en el trabajo diario, por las charlas y los momentos compartidos. Pau, gracias por ayudarme en los experimentos de los últimos años y por la ayuda que nos diste a todos en el bioterio y además por enseñarme un nuevo desafío y responsabilidad: a ser directora asistente de tu tesina, espero cumplir ese rol lo mejor posible.

A la nueva generación del lab: **Stefi, Marianne y Luciana**. Gracias por renovar el espíritu del laboratorio con el entusiasmo y las ganas de aprender que tienen y por la predisposición y buena onda que le ponen a las cosas nuevas.

A **Paol**, mi primer guía, la persona que me enseñó a hacer muchas de las cosas que hoy presento en esta Tesis. Gracias por tus palabras, los momentos compartidos, tu paciencia (¡Sobre todo con tanto estrógeno dando vueltas en el Lab!). Gracias por enseñarme a ser rigurosa y exigente en el trabajo diario (aunque también aprendí tus manías, ¡me lavo las manos 25 veces por día!) y por todas las cosas que compartimos durante todos estos años, no sólo cosas laborales sino también personales. Sos una persona de gran corazón y esas son las cosas más lindas que uno se lleva de estos años, la buena gente que te acompaña.

A **Naty, Diego, Vero y M. Laura**, con quienes también compartí muchos gratos momentos. Gracias chicos por toda su ayuda y todas las mañanas y tardes compartidas durante tanto tiempo. Naty no me voy a olvidar más el día que rompiste bolsa en el lab y más tarde llegaba Santi, ¡somos un lab todo terreno! Hoy por diversos motivos cada uno está en una nueva etapa de sus vidas y les deseo de corazón todo lo mejor porque se lo merecen.

A **Marina**, compañera nacional e internacional. Gracias por todos los momentos que compartimos trabajando en Argentina pero también todos los momentos lindos vividos durante mi estadía en San Diego. ¡Gracias por “adoptarme” con Tomy durante esos meses y hacer que no me sienta sola en un mundo y una experiencia tan distinta! Sos una persona muy laboradora, sensible y compañera y estoy muy contenta que pronto vamos a volver a trabajar juntas.

A **Pato**, con quien compartí algunos años de trabajo en mis comienzos en el lab. Gracias por las charlas, los cafés, la buena onda y la garra que le pusiste a todo. Hoy a la distancia se te extraña pero sé que tenés la oportunidad que te merecés. Gracias porque siempre estas dispuesta a ayudar y por los lindos momentos compartidos.

A mi consejero de estudios **Juan Carlos Calvo** o “Tío Calvo” como lo recordamos cariñosamente sus alumnos. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudar con una sonrisa, porque transmitís que te gusta lo que hacés, por tus ganas de enseñar y que los alumnos disfruten de las clases. Sos un gran profesor e investigador, pero por sobre todo una gran persona.

A los **Becucuevinos: Dama, Isa, Guille, Ceci, Laucha, Mari, Ana, Caro, Bettina, Rodri y Gaby**. Gracias por estar dispuestos a dar una mano siempre, por la ayuda, la buena onda, los congresos compartidos y las reuniones de fin de año. Son, junto con las Graceland Girls, nuestros primos científicos.

A las chichis de **Graceland: Gra, Vicky, Lara, Maru, Ceci y Claris**. Gracias por todo, por su buen humor y sus ganas de pasar un buen momento haciendo lo que nos gusta. Por todas las reuniones y los momentos fuera del trabajo. Espero que todos los años que vengan sean con mucho éxito para este nuevo grupo de trabajo que tiene mucha capacidad y talento. Vicky a la distancia lo mejor para vos y gracias por todo y por los viajes compartidos!

A **Susi Rulli, Betina González y Lau Ratner**. Gracias a las tres porque siempre estuvieron dispuestas a colaborar con lo que necesitábamos, desde escuchar mis decepciones cuando las cosas no funcionan hasta prestarnos reactivos o cosas que precisábamos. Susi, es lindo pensar que nuestra colaboración surgió post-tesis de licenciatura y hoy ya me estoy doctorando (¡cómo pasa el tiempo!). Bet, quiero agradecerte particularmente por luchar juntas para medir la expresión de *Kiss1*, gracias por la ayuda con la RT y por tu buena onda durante los experimentos de pulsatilidad, compartimos lindos momentos.

A **Gustavo Somoza y Carina López**. Gracias por toda la ayuda con las inmunos de GnRH, por recibirme en el INTECH y enseñarme la técnica y por toda la predisposición que siempre tuvieron con nosotros. Es buenísimo tener gente alrededor con ganas de ayudar y dar una mano en las cosas cotidianas.

A **Fernanda Parborell y Leopoldina Scotti**. Gracias por la ayuda con el recuento de estructuras ováricas.

A **Andrés Varani**, gracias por estar siempre dispuesto a darnos una mano con los ratones y los genotipos.

Al **Kauffman Lab: Sasha, Sheila, Sangeeta, Matt, Kristen, Azim, Josh, Tal y Stephanie**. Gracias por todo lo que me enseñaron durante mi estadía en UCSD, San Diego, ¡hice un curso intensivo de kisspeptina en dos meses! Gracias por la predisposición y la buena onda. Me llevo los mejores recuerdos de mi estadía allí y tengo la esperanza de volver algún día y continuar nuestra colaboración.

Al **IBYME** y a toda la gente que trabaja allí que hace lo mejor posible para tener un lugar de trabajo con una gran calidad profesional y humana. Gracias a la dirección, los grupos de trabajo, los técnicos y veterinarios de bioterio, la gente de seguridad, higiene, mantenimiento, limpieza, biblioteca, recursos humanos, administración y a todos los que de alguna manera hacen posible el trabajo diario.

A **CONICET, ISN-CAEN, UBA y ANPCyT** por brindarme los recursos económicos y los subsidios para poder realizar esta tesis. A la UBA por brindarme una enseñanza pública, gratuita y de calidad durante estos años.

Por otro lado quiero agradecerles a mi familia y mis amigos, aquellos que te sostienen y te guían a lo largo de este camino pero del otro lado, a veces sin entender muy bien de que se trata esto que tanto me gusta hacer. Gracias por el apoyo incondicional en todos mis proyectos y por fortalecerme para llegar a la meta.

A **papá, mamá y Meli**, mi familia. Gracias ma y pa porque por ustedes soy lo que soy. Ustedes me formaron y me inculcaron los valores de la vida y no habría llegado hasta acá sin ellos. Gracias por enseñarme que el estudio y el trabajo son cosas importantes y que en la vida hay que luchar por las cosas que uno quiere para conseguirlas, que las cosas no vienen de arriba sino que hay que poner todo tu esfuerzo para conseguirlas. Gracias por todo el amor que me brindaron, por estar a mi lado siempre y por el ejemplo de familia que me dieron. Meli, hermanita, gracias por estar siempre, porque por más que discutamos por pavadas (típico de hermanos) te adoro con el alma. Gracias por tu complicidad, por tu confianza, por tu sensibilidad y por aguantarme cada vez que te doy consejos cual madre, quiero que sepas que solo lo hago por tu bien, porque quiero lo mejor para vos. Sos una gran personita con mucho talento y espero que la vida te de lo mejor porque te lo merecés. ¡Los amo a los tres!

A **Agus**, mi amor, mi compañero de vida, mi todo. Gracias por tu contención, tus palabras justas, por estar a mi lado en todo momento, por el aguante en mis picos de estrés y por tus “sí se puede, un esfuerquito más amor”, porque gracias a eso, en los tropiezos y caídas, me levanté y seguí adelante poniéndole toda la garra. Gracias por confiar en mí y apoyarme en las decisiones que tomé, gracias por alentarme a hacer una pasantía en el exterior sabiendo que era importante para mi desarrollo profesional. Esta tesis también es parte tuya, porque estuviste a mi lado de comienzo a fin y hasta podría decir que hiciste un curso intensivo en Real Time, RIA y cuidado de animales de laboratorio. Gracias por crecer a mi lado y por todo el amor que me das. Este fue un año de muchas alegrías para nosotros y estoy segura que todo lo que se viene será muchísimo mejor aún, con muchos sueños y proyectos en común por cumplir. Sos la persona que ilumina mi camino y con la que quiero pasar el resto de mi vida. Con todo mi corazón te dedico esta tesis. ¡Te amo con todo mi ser!

A mis **abuelos**. A **Naná**, gracias Nani por esos abrazos incomparables que solo las abuelas saben dar, por todas las velas que prendiste para los exámenes, por estar siempre con nosotros y alegrarte con cada uno de nuestros logros. Y a los que me guían desde alguna estrella y que hoy se alegran y brindan conmigo por este nuevo logro: mi abuelo **Mingo**, mi abuela **Mary y Tatá**. Por siempre en mi corazón.

A mis **tíos y primos** porque siempre están ahí para compartir mis alegrías y acompañarme en los momentos difíciles. Gracias por todos los momentos compartidos a lo largo de la vida y por crecer a mi lado. Y a mis primos en particular quiero agradecerles porque trajeron a nuestras vidas a esas personitas que llenaron de luz y de alegría la familia, que transmiten paz y me hacen olvidar de todos los problemas: **Dani, Mateo, Lucía, Juana, Emilia y Juan**, sus sonrisas me hacen olvidar todo y me brindan felicidad en estado puro.

A la **Flia. Calvetti**, gracias por hacerme sentir tan querida y por la buena onda de siempre. Gracias por las reuniones, los asados, los cumpleaños y todos los buenos momentos que pasamos juntos, pero por sobre todo gracias porque sin Uds. hoy no tendría al amor de mi vida al lado.

A **Noe, Marian, Julia y Manu**, mis amigos más cercanos de la facu. Gracias por estar conmigo desde los comienzos de este camino, allá por el CBC, gracias por las tardes de estudio compartidas, los cursos, los viajes en tren o subte (sin Uds. son eternoos), las palabras de aliento, los lindos momentos juntos y por compartir este desafío conmigo. Es increíble pensar que ya los conozco hace tanto tiempo y aunque a veces no nos veamos tan seguido, cada minuto compartido, mail o mensaje te hace dar cuenta que igual los tengo cerca. Los quiero mucho y me alegra que sean excelentes profesionales, hasta el Nobel no paramos eh!!!

A mis amigos de la vida: **Gaby**, mi amiga/hermana del alma, gracias por estar ahí SIEMPRE, por tus palabras justas, por tu compañía, por las tardes de mate, por tooodas las cosas hermosas que pasamos durante todos estos años (desde jardín de infantes) y por acompañarme en los malos momentos, ¡te quiero mucho!; **Gastón, Caro y Maru**, gracias por todos los momentos vividos juntos, porque aunque a veces no los vea seguido los recuerdo y tengo presentes en mi corazón; **Ceci y Gonza, Flopa, Dari y Leti, Lucas, Emma, Barbi y Manu**, mis amigos “heredados”, ¡pero qué herencia que me gané!, gracias porque están siempre dando palabras de aliento, por todos los hermosos momentos que compartimos y gracias por creer y confiar en mí, aunque debo admitirles que no creo que salga en la revista Gente, Hola o Susana chicos, ¡lamento decepcionarlos! Gracias a todos por tratar de entender que es esto de “matar ratitas” y “trabajar en CONICET”. Son excelentes personas y me siento feliz de tenerlos en mi vida y que seamos amigos.

Gracias a todos, sin ustedes no hubiese llegado hasta acá. ¡¡¡¡GRACIAS!!!!

“Tengamos ideales elevados y pensemos en alcanzar grandes cosas, porque como la vida rebaja siempre y no se logra sino una parte de lo que se ansía, soñando muy alto alcanzaremos mucho más. Para una voluntad firme, nada es imposible, no hay fácil ni difícil; fácil es lo que ya sabemos hacer, difícil, lo que aún no hemos aprendido a hacer bien”.

Bernardo Houssay.

Con todo mi corazón dedico esta Tesis a mis padres y mi hermana, quienes formaron la persona que soy hoy, y a Agus, mi amor, quien me acompaña en cada momento y con el que tengo muchos sueños por cumplir.

Introducción	4
Sistema reproductor.....	4
Hipotálamo	4
Hipófisis	7
Relación neurohemal entre el hipotálamo y la adenohipófisis	8
Gónadas.....	10
Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.....	12
Kisspeptina	12
GnRH.....	19
Aminoácidos	21
Regulación GABAérgica del eje gonadotrófico	28
Interacción entre Kisspeptina y GABA	32
Regulación del ciclo ovárico	33
Ciclo Ovárico.....	33
Ciclo Estral	36
Relación entre el sistema GABAérgico, la epilepsia y desórdenes reproductivos.....	39
Modelo de estudio: ratones carentes de la expresión del RGABA _B funcional (GABA _{B1} KO)	41
Hipótesis y objetivos	44
Hipótesis.....	44
Objetivos	44
Objetivo general	44
Objetivos específicos	44
Materiales y métodos	45
Animales.....	45
Mantenimiento y propagación de la colonia GABA _{B1} KO	45
Genotipificación de ratones GABA _{B1} KO.....	46
Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico.....	46
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y visualización en gel de agarosa	47
Expresión de genes de interés y localización neuronal mediante hibridización in situ (HIS).....	49
Obtención y preparación de muestras	49
Diseño, cuantificación y marcación con ³³ P de sondas para HIS	49
HIS marcación simple	50
HIS marcación doble.....	51
Análisis.....	52
Expresión de genes de interés.....	52
Expresión de genes de interés en núcleos hipotalámicos específicos (qPCR).....	52
Expresión de genes de interés en tejidos (sqPCR y qPCR).....	55
Localización de neuronas GnRH por inmunohistoquímica (IHQ)	62
Obtención, preparación e inclusión de las muestras.....	62
Obtención de cortes y protocolo de IHQ para GnRH.....	63
Análisis.....	64
Evaluación de la liberación pulsátil de GnRH	64
Medición de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	65
Obtención y preparación de las muestras.....	65
Procedimiento de determinación por HPLC	66
Medición hormonal por radioinmunoanálisis (RIA)	66
Obtención y preparación de las muestras.....	66
RIA para hormonas proteicas	68
RIA para hormonas esteroideas	72
Evaluación del porcentaje de ovulación y recuento de ovocitos en la ampulla.....	75
Recuento de estructuras ováricas	75
Obtención muestra, inclusión y cortes.....	75
Tinción con HE	76
Análisis estadístico	76
Capítulo I: eje gonadotrófico en ratones adultos WT y GABA_{B1}KO	78
Introducción I	78

Objetivo I	80
Resultados I A. Eje gonadotrófico: hipotálamo	80
Colocalización de los ARNm de <i>Kiss1-RGABA_{B1}</i> (HIS) en los núcleos hipotalámicos AVPV/PeN y ARC de hembras	80
Expresión de <i>Kiss1</i> en los núcleos hipotalámicos AVPV/PeN y ARC (HIS)	81
Expresión de <i>Kiss1</i> en los núcleos hipotalámicos AVPV/PeN y ARC (qPCR)	83
Expresión de <i>Gnrh1</i> en área preóptica (HIS)	85
Expresión de <i>Gnrh1</i> en hipotálamo, bulbo olfatorio y corteza (qPCR).....	86
Liberación pulsátil de GnRH a partir de explantos hipotalámicos.....	88
Liberación pulsátil de GnRH a partir de hipotálamos incubados con Kiss-10 y/o Kiss-234	90
Expresión de <i>Gad1</i> en hipotálamo y corteza (qPCR)	93
Correlación entre la expresión de <i>Gnrh1</i> y <i>Gad1</i> en hipotálamo	95
Contenido aminoacídico: GABA, glutamato y taurina (HPLC)	95
Expresión del receptor de estrógeno y aromatasa en hipotálamo (qPCR).....	97
Expresión del receptor de progesterona en los núcleos hipotalámicos AVPV/PeN y ARC (qPCR)	100
Expresión de tirosina hidroxilasa en los núcleos hipotalámicos AVPV/PeN y ARC (qPCR).....	101
Resultados I B. Eje gonadotrófico: adenohipófisis	103
Expresión de <i>Gnrh1r</i> en adenohipófisis (qPCR).....	104
Expresión de <i>Lhb</i> en adenohipófisis (qPCR).....	105
Contenido y niveles séricos de LH, FSH y PRL (RIA)	105
Resultados I C. Eje gonadotrófico: gónadas	107
Contenido y niveles séricos de esteroides gonadales (RIA).....	107
Peso de gónadas y útero	109
Ovulación y número de ovocitos ovulados.....	110
Recuento de estructuras ováricas (HE).....	112
Discusión I	114
Conclusión I	125
Capítulo II: sistema extra-hipotalámico de <i>Kiss1</i> en ratones WT y GABA_{B1}KO	127
Introducción II	127
Objetivo II	129
Resultados II A. Ratones adultos WT y GABA _{B1} KO	129
Áreas extra hipotalámicas: expresión de <i>Kiss1</i> en amígdala media (MeA)	129
Áreas extra hipotalámicas: expresión de <i>Kiss1</i> en el núcleo base de la estria terminal (BNST).....	130
Áreas extra hipotalámicas: expresión de <i>Kiss1</i> en el <i>septum lateral</i>	131
Expresión de <i>Kiss1</i> en <i>micropunches</i> de áreas extra hipotalámicas: MeA, BNST y <i>septum</i> (qPCR)	132
Resultados II B. Ratones de 14 días de edad WT y GABA _{B1} KO	134
Expresión de <i>Kiss1</i> en áreas hipotalámicas y extra-hipotalámicas (HIS)	134
Entorno hormonal de ratones WT y GABA _{B1} KO a los 14 días de edad	136
Discusión II	140
Conclusión II	144
Capítulo III: eje gonadotrófico en ratones WT y GABA_{B1}KO de 4 días de edad.....	145
Introducción III	145
Objetivo III	147
Resultados III A. Eje gonadotrófico: hipotálamo	148
Expresión de <i>Kiss1</i> en hipotálamo y núcleos hipotalámicos específicos (sqPCR y qPCR).....	148
Expresión de <i>Kiss1r</i> en hipotálamo (qPCR).....	152
Localización de neuronas GnRH (IHQ).....	155
Expresión de <i>Gnrh1</i> en hipotálamo (qPCR)	156
Contenido de GnRH en HT, BO y CT (RIA).....	158
Expresión de <i>Gad1</i> en hipotálamo (qPCR).....	160
Correlación entre <i>Gnrh1</i> y <i>Gad1</i> (qPCR)	163
Correlación entre <i>Gnrh1</i> y <i>Gad1</i> con <i>Kiss1</i> en HMB (qPCR)	164
Contenido de GABA, glutamato y taurina en HT y CT (HPLC).....	164
Expresión de aromatasa	166
Expresión de <i>Pgr</i> en núcleos hipotalámicos específicos AVPV/PeN y ARC (qPCR).....	167
Expresión de <i>Th</i> en núcleos hipotalámicos específicos AVPV/PeN y ARC (qPCR)	168
Resultados III B. Eje gonadotrófico: hipófisis	170
Expresión del <i>Gnrh1r</i> (qPCR)	170
Contenido y niveles séricos de LH, FSH y PRL (RIA)	171

Resultados III C. Eje gonadotrófico: gónadas	173
Expresión de aromatasa gonadal (qPCR).....	173
Contenido gonadal de testosterona y estradiol (RIA)	174
Discusión III	176
Conclusión III	182
Conclusión final	184
Bibliografía	186

INTRODUCCIÓN

SISTEMA REPRODUCTOR

Una de las características adaptativas más importantes de los organismos superiores es su capacidad de mantener la constancia del medio interno (homeostasis) ante variaciones del medio externo. En este proceso, tanto el sistema nervioso como el endocrino juegan papeles fundamentales. Es fácilmente comprensible la importancia que adquieren las relaciones entre dichos sistemas de integración: el sistema nervioso controla la actividad endocrina y las hormonas regulan la función nerviosa (Halasz 2000).

El estudio de dicha interacción dio origen a la neuroendocrinología. El paradigma de esta integración está dado por dos estructuras muy relacionadas: el hipotálamo y la hipófisis. Estas estructuras establecen una conexión anatómica y fisiológica continua, interactiva y altamente eficiente entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema endocrino, dando lugar a la unidad funcional hipotálamo-hipofisario (Page 1988). Este sistema, a su vez, regula, entre otras, la función gonadal, formando lo que se denomina eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG) o gonadotrófico, el cual cumple un rol importantísimo en la perpetuación de las especies, ya que es el responsable de la función reproductiva.

HIPOTÁLAMO

El hipotálamo (HT) es la estructura fundamental que monitorea el medio interno (estado metabólico, hormonal, etc.) y externo (luz, temperatura, presencia del sexo opuesto, etc.), siendo en los organismos superiores, el principal centro integrador de los estímulos que recibe de otras áreas del SNC, así como de los niveles de hormonas circulantes (Levine 2000).

Esta estructura es de origen neuroectodérmico (surge por evaginación del piso diencefálico) y se extiende bajo el tálamo, comprendiendo la zona gris que rodea ventralmente al tercer ventrículo. Su límite anterior es el plano frontal que atraviesa la comisura anterior, y su límite posterior, el plano que atraviesa 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 y su celularidad no se agrega en núcleos definidos (Silverman & 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.

Dentro del HT pueden reconocerse cuatro regiones principales, organizadas rostro-caudalmente en: área preóptica, hipotálamo anterior, hipotálamo medio e hipotálamo posterior (Palkovits 2000). Los núcleos más relevantes de las mismas son:

- *En el 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. Este área incluye al núcleo dimórfico sexual. 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 neuroendocrino.
- *En el hipotálamo anterior (HA)*: el núcleo periventricular (proyecta a la EM) y dentro de éste se encuentra el núcleo antero ventro periventricular (AVPV), donde se alojan las neuronas que secretan kisspeptina que interactúan con las de GnRH, y los núcleos supraóptico, paraventricular (proyecta fundamentalmente hacia el lóbulo neural) y supraquiasmático (reloj biológico para las regulaciones neuroendocrinas).
- *En el hipotálamo medio (HM)*: aquí se reconocen tres partes: el hipotálamo medio basal (HMB), el dorsal (HMD) y el lateral (LHT). Esta región incluye a la EM y a los núcleos arcuato (ARC), ventromedial (VMN) y dorsomedial (DMN) que proyectan hacia EM.
- *En el hipotálamo posterior (HP)*: aquí se encuentran los cuerpos mamilares. El núcleo premamilar ventral proyecta hacia EM.

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).

Las conexiones neurales del HT 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 extra-hipotalámicas (Halasz 2000; Palkovits 2000). Se ha descrito un gran número de vías aferentes que comunican diversas regiones del SNC con el HT, el bulbo olfatorio (BO) entre ellas, y además se ha postulado la existencia de conexiones neuronales aferentes y eferentes entre el HT y otros órganos fuera del SNC, como ser la glándula adrenal y las gónadas. Entre las vías eferentes más conocidas del HT se encuentran aquellas que lo comunican con la hipófisis: los tractos supraóptico y paraventriculo hipofisarios que atraviesan la zona interna de la EM llegando a la hipófisis posterior; y por otro lado, las fibras que se originan en APO, núcleo paraventricular, núcleo periventricular anterior y núcleo ARC, que llegan a la zona externa de la EM, en estrecho contacto con los capilares del plexo portal primario superior (Figura 1).

La información entrante a través de vías humorales y neurales es registrada, analizada e integrada en neuronas hipotalámicas. De esta forma, algunas neuronas responden liberando, de manera pulsátil al sistema porta hipofisario, diferentes neurohormonas, que llegan a la adenohipófisis y actúan sobre sus células blanco regulando su función. Generalmente, la concentración de estas sustancias es mucho más elevada en la sangre portal que en la circulación periférica.

Según su propiedad de estimular o inhibir la actividad de la hipófisis, estas neurohormonas se denominan hormonas liberadoras o inhibitorias 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. Una de las neurohormonas hipofisotróficas más conocidas es: la hormona liberadora de gonadotrofinas, GnRH. Sin embargo, a lo largo de esta introducción, también mencionaremos otros actores importantes a nivel hipotalámico, como la kisspeptina, péptido descubierto recientemente, que regula

directamente la secreción de GnRH, o el ácido γ aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio del SNC, el cual también regula a las neuronas GnRH.

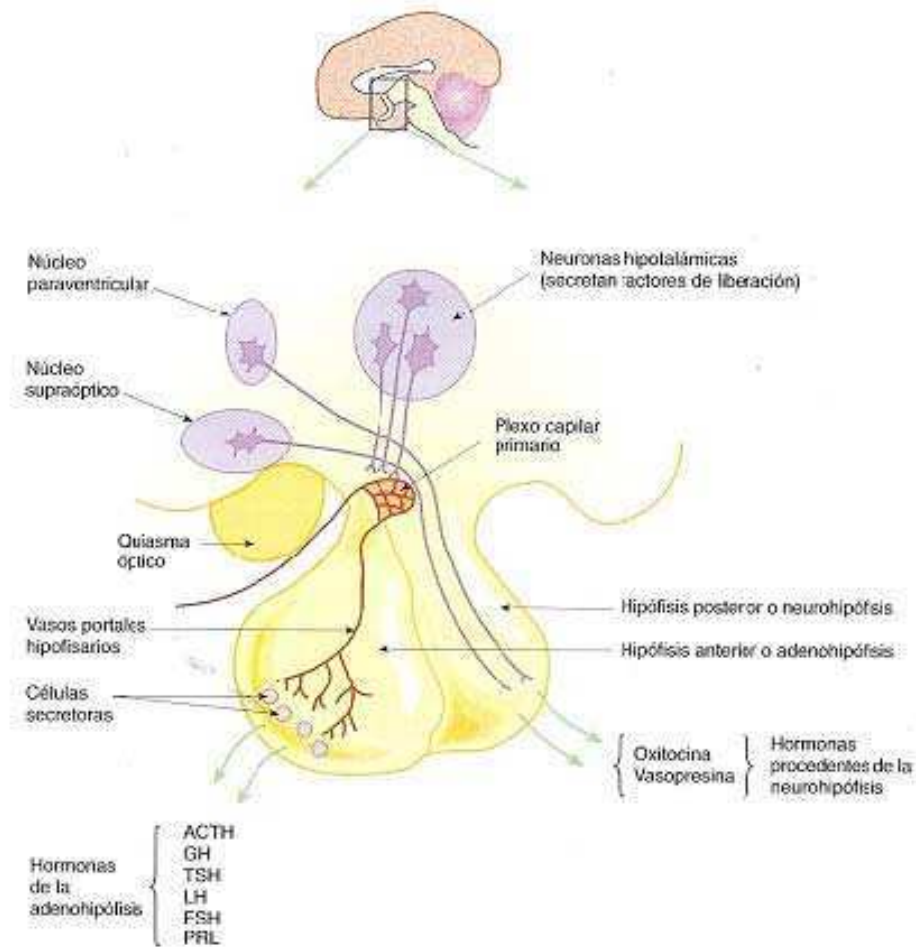


Figura 1. Esquema de los mecanismos neurohumorales que controlan la función de la hipófisis. Tomado de G. Pocock (Pocock & Richards 2002).

HIPÓFISIS

La hipófisis es un cuerpo pequeño, bilobulado, situado en la base del cerebro, ubicado sobre una depresión en la base del cráneo llamada silla turca del esfenoides. Se ubica por debajo del hipotálamo, con el que se conecta por un tallo o pedículo, y se extiende hacia abajo desde el diencefalo. Esta glándula está compuesta por dos estructuras embriológica y funcionalmente diferentes, la neurohipófisis o hipófisis posterior y la adenohipófisis o hipófisis anterior (HF), que se encuentran adheridas en roedores y humanos (Page 1988).

La neurohipófisis es de origen neuroectodérmico y se origina a partir de la evaginación del piso diencefálico del tercer ventrículo (proyección del HT) y se diferencia en tres subdivisiones: la EM, importante para la integración del eje hipotálamo-adenohipofisario; el tallo infundibular, el cual contiene terminales axónicas secretoras de GnRH, entre otras hormonas liberadoras e inhibidoras de hormonas hipofisotróficas; y por último, el proceso infundibular o *pars nervosa*, lugar donde termina el tracto dopaminérgico túbero-hipofisario y otros sistemas conteniendo diferentes neurotransmisores, como ser el del ácido y aminobutírico (GABA).

La HF es la porción glandular del cuerpo hipofisario. Existen dos teorías sobre el origen de esta glándula. En la teoría más antigua se postula que la HF surge de tejido ectodérmico que evagina del *stomadeum* de la boca primitiva: la bolsa de Rathke. Sin embargo existe otra teoría que dice que la HF se origina a partir de un placode neurohipofisario, al borde de la placa neural, que luego se invagina. En ambos casos, el origen sigue siendo ectodérmico. Esta estructura se subdivide en tres regiones anatómicas: *pars distalis*, *pars tuberalis* y *pars intermedia*.

Dentro de la HF, en la *pars distalis*, se encuentran células epiteliales que se clasifican por sus productos secretorios específicos, dentro de las cuales encontramos a los gonadotropos, células secretoras de gonadotrofinas: hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), los lactotropos, células secretoras de prolactina (PRL), los somatotropos, células secretoras de hormona de crecimiento (GH), corticotropos células secretoras de corticotrofina (ACTH), tirotropos, células secretoras de tirotropina (TSH) y las células folículoestrelladas (no son secretoras de hormonas), además de tejido conectivo y vascular.

RELACIÓN NEUROHEMAL ENTRE EL HIPOTÁLAMO Y LA ADENOHIPÓFISIS

La hipófisis de los mamíferos se comunica con el SNC mediante conexiones vasculares y nerviosas. La regulación hipotalámica de la secreción de hormonas del lóbulo anterior de la adenohipófisis es fundamentalmente endocrina y se lleva a cabo mediante los sistemas portales hipofisarios (Halasz 2000).

La adenohipófisis no recibe un suministro arterial directo, sino que éste 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).

La principal irrigación de la HF 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 neurosecretoras 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. De ambos sistemas porta hipofisarios emergen venas hipofisarias que drenan en los senos cavernosos. De esta manera las hormonas liberadas por la hipófisis alcanzan la circulación general y sus órganos blanco distantes (Figura 2).

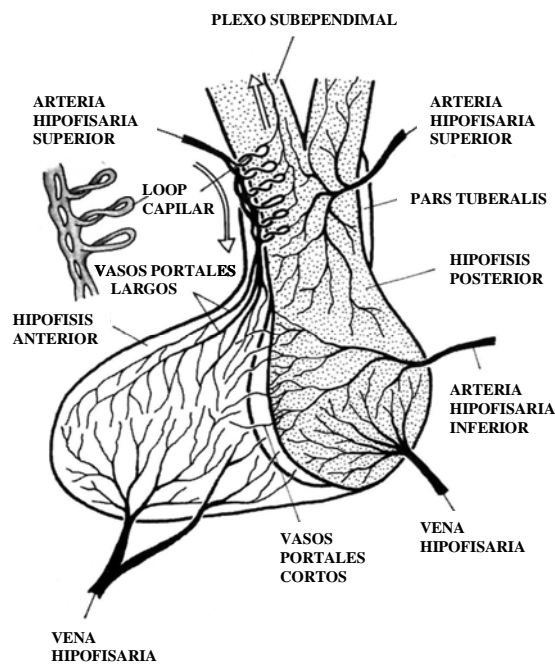


Figura 2. Esquema del sistema vascular portal hipofisario. Tomado de B. Halasz (Halasz 2000).

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).

GÓNADAS

El otro componente importante de los ejes endocrinos es la glándula efectora. En el caso del eje reproductivo, éstas son las gónadas, las cuales responden a las señales endocrinas de la hipófisis. A continuación mencionamos las características anatómo-funcionales de las gonadas para cada sexo.

OVARIO

En los mamíferos, los ovarios son los órganos de almacenamiento y desarrollo de los ovocitos formados durante la vida embrionaria/fetal o cercana al nacimiento, y también el principal asiento de las células secretoras de hormonas femeninas en las hembras. Son glándulas pares, localizadas entre la pelvis, suspendidas por el ligamento ancho del útero mediante una inserción denominada mesovario (pliegue especial del peritoneo que transporta vasos sanguíneos hacia los ovarios. Está recubierto por un epitelio germinal cuboideo y por debajo, por la Túnica Albugínea, cápsula de tejido conectivo colagenoso denso (Gartner L P & Hiatt J L 1997).

El ovario quiescente es un ovoide pequeño y aplanado, de estructura compacta y con una superficie relativamente lisa (Driancourt *et al.* 1993). Cuando alcanza la edad reproductora, se presenta como uno de los más dinámicos y con múltiples cambios morfológicos continuos (Robinson & Goy 1986). El ovario se origina a partir de la cresta genital, que se surge como un engrosamiento de la esplacnopleura en el que también participan las células del mesénquima adyacente. Contienen células germinales, a partir de las cuales se formarán más tarde los óvulos. Cuando estas células se asientan en el ovario, se las denomina ovogonias (células diploides), quienes sufren una división mitótica dando lugar a oocitos I (diploides). Éstos inician una división meiótica, arrojándose en Profase I. En los diferentes grados de maduración, el oocito estará rodeado por células foliculares, derivadas del tejido conjuntivo, formando los denominados folículos ováricos (Kardong K V 2007).

De esta forma, se puede dividir el parénquima del ovario en: 1) Corteza ovárica, periférica, compuesta por una red de conectivo llamado estroma, folículos ováricos en

diversos estadios de desarrollo y células del tipo fibroblastos; 2) Médula ovárica, central, que consiste en tejido conectivo laxo altamente vascularizado e innervado. (Gartner L P & Hiatt J L 1997).

TESTÍCULO

Los testículos, gónadas masculinas, son dos órganos glandulares ovales que se encuentran ubicados por fuera de la cavidad abdominal en un saco de piel denominado escroto. Son los encargados de la producción de andrógenos y de proporcionar el entorno adecuado para la producción de espermatozoides (Geneser 2000).

Los testículos de los mamíferos se pueden dividir funcional y estructuralmente en dos compartimientos: el tubular y el intersticial. La mayor parte del volumen testicular está ocupado por los túbulos seminíferos, los cuales conforman la unidad productora de espermatozoides y están compuestos por un epitelio seminífero que contiene dos tipos principales de células: las células de Sertoli, y las células de la serie espermatogénica, que comprenden las espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, espermátides y espermatozoides (Geneser 2000). El tejido intersticial que completa los espacios entre los túbulos seminíferos contiene las células de Leydig, principal fuente productora de andrógenos, mastocitos y macrófagos, vasos sanguíneos y linfáticos y terminaciones nerviosas. Las células de Leydig se asocian a los vasos sanguíneos y a las paredes de los túbulos seminíferos, y su número varía según la especie, observándose mayor producción de andrógenos en aquellas especies donde existe un mayor número de células de Leydig (Setchell *et al.* 1994).

Además de los efectos conocidos de los andrógenos en el desarrollo y mantenimiento de los órganos sexuales masculinos, éstos ejercen acciones de diferenciación sexual sobre el cerebro en desarrollo, principalmente por su conversión de testosterona a estradiol (aromatización), tema que abordaremos en mayor profundidad más adelante.

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, de agua y electrolitos, respuesta a estrés y función inmune. Recíprocamente, la actividad hipotalámica y las hormonas 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 endocrinas blanco, en nuestro caso el interés se centra en las gónadas, 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 HT.

Por otra parte, las hormonas hipofisarias, como también las hormonas hipotalámicas 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).

Además de las señales periféricas y centrales, la función hipofisaria está regulada por interacciones intraglandulares autocrinas y paracrinas (Schwartz *et al.* 1998; Ray & Melmed 1997). La distribución de los distintos tipos de células dentro de la glándula no es al azar, sino que sigue una histoarquitectura definida, que es la base estructural de esta organización funcional horizontal en la cual las células hipofisarias ejercen un control mutuo de su función y diferenciación.

KISSPEPTINA

Las kisspeptinas son una familia de péptidos relacionados estructuralmente, codificadas por el gen *Kiss1*, que se unen y activan un receptor acoplado a proteína G, denominado *Kiss1r*. Estos elementos fueron identificados entre 1996 y 2001, pero su asociación con la fisiología reproductiva no se conoció en ese momento. De hecho, las

kisspeptinas fueron catalogadas en primera instancia como supresores de metástasis (Lee & Welch 1997). Recién en 2001 se realizó la caracterización de los productos peptídicos del gen *Kiss1* (Ohtaki *et al.* 2001).

Las kisspeptinas derivan de un mismo precursor, denominado prepro-kisspeptina, que en el humano posee 145 aminoácidos. La proteólisis de este precursor da lugar a un péptido de 54 aminoácidos (kisspeptina-54), denominado primeramente como metastina, el cual es el producto mayoritario del gen *Kiss1* (Ohtaki *et al.* 2001) y al que denominaremos kisspeptina a lo largo de esta Tesis. Los otros fragmentos peptídicos que se generan (kisspeptina-14, 13 y 10) comparten el extremo carboxi-terminal y la secuencia característica de la familia de péptidos RF (Arg-Phe-NH₂) con kisspeptina (Figura 3). Mientras que en el humano kisspeptina está formada por 54 aminoácidos, en ratón y rata sólo por 52 y la secuencia RF está modificada por una tirosina (Arg-Tyr-NH₂) (Pinilla *et al.* 2012).

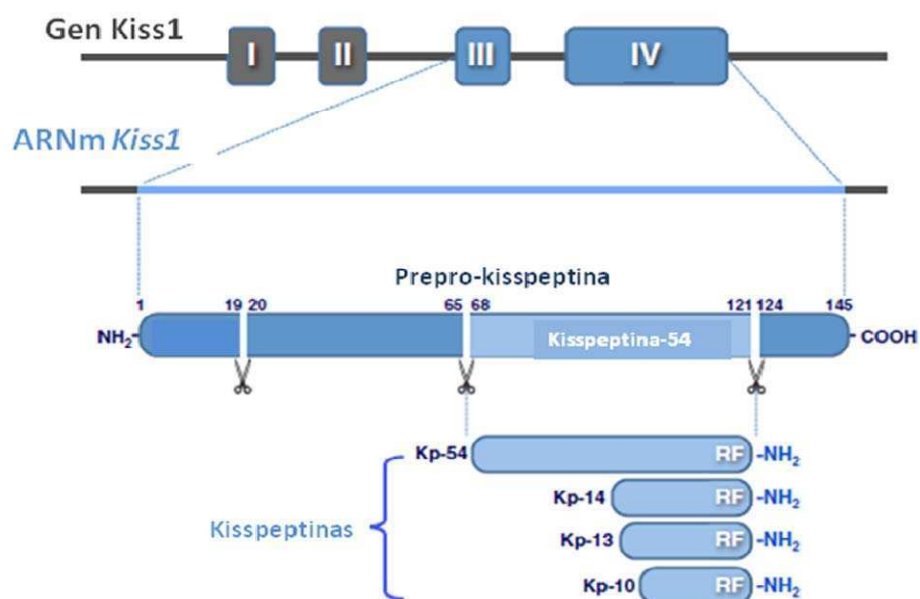


Figura 3. Esquema de las características estructurales principales de las kisspeptinas, productos del gen *Kiss1*. Modificado de L. Pinilla (Pinilla *et al.* 2012).

El receptor de kisspeptina, *Kiss1r*, fue identificado en el cerebro de rata en 1999 como un receptor huérfano. Luego, en el año 2001, fue descrito como receptor de los péptidos derivados del gen *Kiss1* (Ohtaki *et al.* 2001). También se sabe que todos los péptidos son capaces de unirse y activar al receptor de kisspeptina, siendo el

fragmento de 10 aminoácidos, kisspeptina-10, el que posee la máxima actividad (Pinilla *et al.* 2012).

ROL DEL SISTEMA *KISS1/KISS1R* EN LA REPRODUCCIÓN

Aunque los elementos del sistema *Kiss1/Kiss1r* fueron descubiertos en 2001, recién en 2003 se descubrieron sus funciones reproductivas. En ese año se presentaron dos trabajos independientes (de Roux *et al.* 2003; Seminara *et al.* 2003) que demostraron la presencia de deleciones o mutaciones del receptor de kisspeptina en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrófico, los cuales poseían deficiencia en la secreción de gonadotropinas, alteraciones en la función gonadal e infertilidad de origen central. Recientemente, Topaloglu y col. reportaron el primer caso de inactivación del gen *Kiss1* en humanos el cual también provoca hipogonadismo hipogonadotrófico (Topaloglu *et al.* 2012). Estos estudios fueron reforzados con estudios en ratones carentes de *Kiss1r* (*Kiss1rKO*) (Funes *et al.* 2003; Seminara *et al.* 2003) o de *Kiss1* (*Kiss1KO*) (d'Anglemont, X *et al.* 2007) 234), los cuales presentaron un fenotipo similar a los pacientes estudiados anteriormente, aunque el ratón *Kiss1KO* presentó un impacto reproductivo moderado con respecto al *Kiss1rKO* (Colledge 2009). Dado que la migración de neuronas GnRH, la síntesis de GnRH o la respuesta hipofisaria a GnRH no se encontraba afectada en pacientes con alteraciones en la señalización de kisspeptina (Seminara *et al.* 2003; d'Anglemont, X *et al.* 2007), se propuso al sistema *Kiss1/Kiss1r* como un potente regulador de las neuronas GnRH y la falta de una correcta señalización de *Kiss1* da lugar a la supresión de la secreción de GnRH, por ende este sistema se convierte en uno de los principales reguladores del eje gonadotrófico.

LOCALIZACIÓN DE NEURONAS *KISS1* EN HIPOTÁLAMO Y SU ROL EN EL EJE GONADOTRÓFICO

La expresión de *Kiss1* ha sido descrita principalmente en el hipotálamo de roedores y de otros mamíferos, incluyendo cerdos, ovejas, caballos y primates, dentro de los cuales también en humanos (Pinilla *et al.* 2012).

Las neuronas *Kiss1* se encuentran en dos núcleos hipotalámicos discretos: el núcleo arcuato (ARC), localizado en el HMB, o en la región infundibular, su equivalente en primates, y en el *continuum* núcleo anteroventral periventricular - núcleo periventricular (AVPV/PeN), localizado en el HA (Pinilla *et al.* 2012). Además se sabe

que las neuronas *Kiss1* del AVPV/PeN co-expresan otros neuropéptidos, como tirosina hidroxilasa (TH) y galanina (Kauffman *et al.* 2007a; Semaan *et al.* 2010; Kallo *et al.* 2012) y que las del núcleo ARC co-expresan neurokinina B (NKB) y su receptor NK3R y dinorfina, por lo que a esta población se la denomina neuronas KNDy (Lehman *et al.* 2010).

La localización en núcleos discretos del cerebro de las neuronas kisspeptidérgicas se corresponde con funciones definidas. La expresión de *Kiss1* en el AVPV/PeN está sexualmente diferenciada por esteroides actuando perinatalmente, siendo mayor en las hembras adultas (Kauffman *et al.* 2007a) y requiriendo de la participación de *Kiss1r* (Kauffman 2009). Las neuronas *Kiss1* en AVPV/PeN son mediadoras de la retroalimentación positiva de los estrógenos, a través de la activación de receptores de estrógeno alfa (ER α) (Gottsch *et al.* 2009) y participan en el desencadenamiento del pico preovulatorio de LH (Robertson *et al.* 2009) (Figura 4). Las neuronas *Kiss1* en el núcleo arcuato (ARC) son mediadoras de la retroalimentación negativa de los esteroides sexuales (estrógenos y testosterona) sobre la secreción gonadotrófica, activando ER α y receptores de andrógenos (AR) (Navarro *et al.* 2004; Smith *et al.* 2005b; Smith *et al.* 2005a; Gottsch *et al.* 2009) (Figura 4). Sin embargo las neuronas *Kiss1* del ARC no muestran dimorfismo sexual en roedores adultos como lo hacen las del AVPV/PeN (Roseweir *et al.* 2009). Por otro lado, la población neuronal del AVPV presente en roedores, estaría ausente en ovejas, caballos y primates. La ausencia de esta población tendría que ver, contrario a lo que sucede en roedores, con que esta zona no está relacionada con la retroalimentación positiva de estrógenos y la generación del pico pre-ovulatorio de gonadotrofinas en estas especies. Recientemente se ha descrito presencia de neuronas ir-*Kiss1* en el area periventricular en humanos (Hrabovszky *et al.* 2010) y en el APO en ovejas (Franceschini *et al.* 2006).

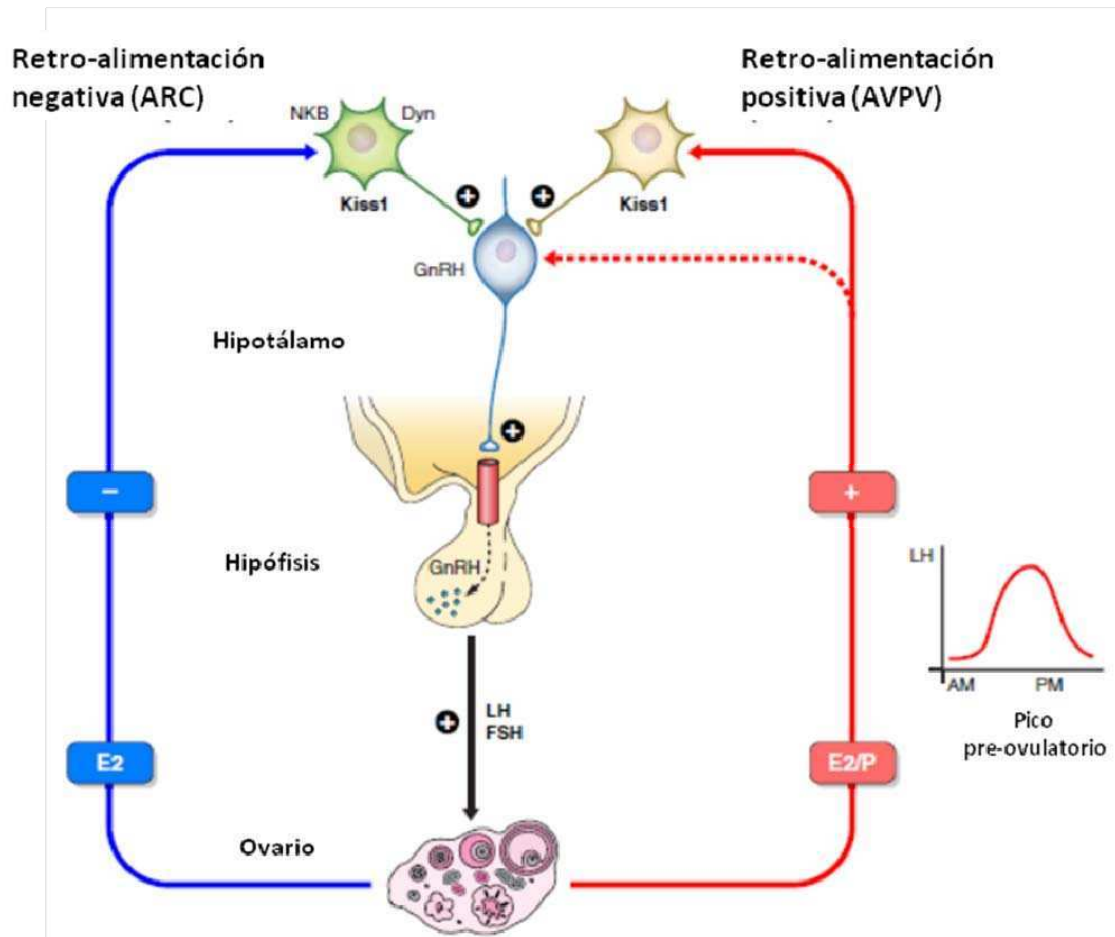


Figura 4. Regulación diferencial y acción de las neuronas *Kiss1* del AVPV y ARC en el control de GnRH en roedores. Modificado de L. Pinilla (Pinilla *et al.* 2012).

La administración de kisspeptina en el sistema nervioso central estimula la secreción de GnRH y gonadotrofinas en animales prepuberales y adultos (Kauffman 2010). En roedores, las neuronas *Kiss1* del AVPV hacen sinapsis con las neuronas de GnRH (Clarkson & Herbison 2006b) y estudios recientes en ratón demostraron que las neuronas *Kiss1* de la porción rostral del ARC (20% del total de neuronas en esta zona), proyectan hacia el APO, probablemente interactuando con las neuronas GnRH (Yeo & Herbison 2011). Se asume que la población de neuronas *Kiss1* del ARC participa de la regulación de GnRH por medio de interneuronas o por acción directa a nivel de las terminales nerviosas de GnRH en la EM (d'Anglemont, X *et al.* 2008). Entonces, mientras las neuronas *Kiss1* del AVPV tendrían un rol fundamental en el pico pre-ovulatorio de GnRH y gonadotrofinas, las del ARC estarían involucradas más bien en el control de la secreción pulsátil de GnRH (Li *et al.* 2009; Navarro *et al.* 2009). Además, se demostró la expresión del *Kiss1r* en hipotálamo y específicamente en las neuronas

GnRH (Herbison *et al.* 2010). De esta manera, se demuestra el rol indiscutible de kisspeptina en la regulación de la secreción de GnRH, actuando tanto directamente sobre las neuronas de GnRH como de forma indirecta a través de interneuronas y su rol diferencial (según las poblaciones existentes) en la regulación del eje gonadotrófico.

Además, se sabe que kisspeptina aumenta de manera drástica en el inicio de la pubertad (Navarro *et al.* 2004). Tanto *Kiss1* como el número de neuronas ir-*Kiss1* en el AVPV aumenta durante esta etapa del desarrollo (Han *et al.* 2005; Clarkson & Herbison 2006b) y depende de la acción estimuladora de los estrógenos en este momento. También aumenta durante este período el número de fibras *Kiss1* que proyectan desde el AVPV hacia las neuronas GnRH (Clarkson *et al.* 2009a). En cuanto a la expresión de *Kiss1* y las neuronas ir-*Kiss1* en el ARC durante el desarrollo, se sabe que también aumenta durante esta transición (Takumi *et al.* 2011) pero su aumento es más modesto con respecto al del AVPV, especialmente en hembras. Durante esta etapa existe un aumento gradual de la expresión del *Kiss1r* (Herbison *et al.* 2010) y en la eficiencia de señalización del *Kiss1r* en las neuronas de GnRH (Han *et al.* 2005).

Todas estas evidencias apuntan a que el sistema de *Kiss1* es fundamental en la eclosión puberal (Figura 5). Esto se debe a: 1) un aumento del tono kisspeptidérgico que activa el eje gonadotrófico; 2) un aumento en el número de neuronas *Kiss1* y sus proyecciones hacia las neuronas GnRH, principalmente provenientes del AVPV en roedores; 3) un aumento en la sensibilidad a los efectos estimuladores de kisspeptina en términos de respuesta de GnRH/LH; y 4) un aumento en la eficiencia de señalización del receptor de *Kiss1*, probablemente debido a una resistencia a la desensibilización al ser estimulado por kisspeptina. Sin embargo, la activación inicial de la función ovárica, que provee la principal fuente de estrógeno en hembras, se produce de manera independiente de kisspeptina, sugiriendo que kisspeptina no sería el primer activador del inicio de la pubertad, al menos en hembras.

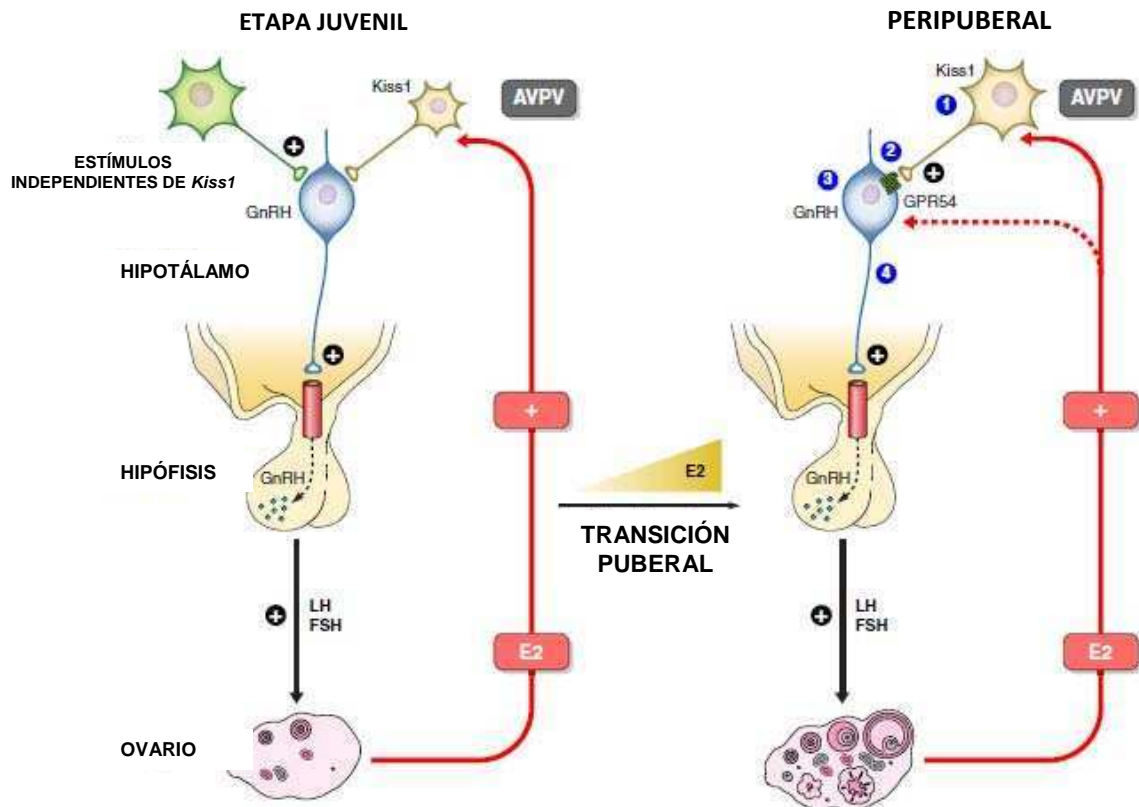


Figura 5. Mecanismos regulatorios y cambios a lo largo de la maduración sexual en el sistema *Kiss1* durante la pubertad en roedores hembra. Modificado de L. Pinilla (Pinilla *et al.* 2012). Los cambios funcionales en el sistema *Kiss1* involucrados en el inicio de la pubertad en roedores son: 1) el aumento de *Kiss1*/kisspeptina en ciertos núcleos hipotalámicos, principalmente el AVPV; 2) el aumento del número de proyecciones o aposiciones entre las neuronas *Kiss1* y GnRH; 3) el aumento en la sensibilidad o respuesta de las neuronas GnRH a kisspeptina, junto con un aumento en la eficiencia del receptor de kisspeptina (*Kiss1r* o *GPR54*) de acoplarse a los efectores de señalización y 4) el aumento de la expresión o el número de *Kiss1r*. Además, la activación del sistema *Kiss1* requiere de los efectos permisivos de los estrógenos.

LOCALIZACIÓN Y ROL DE NEURONAS *KISS1* EN SISTEMAS EXTRA-HIPOTALÁMICOS

Además de localizarse en núcleos hipotalámicos definidos, las neuronas *Kiss1* también se encontraron en sitios extra-hipotalámicos, tales como la amígdala media (MeA), el núcleo preóptico anterodorsal y el núcleo base de la estría terminal (BNST) (Brailoiu *et al.* 2005; Clarkson *et al.* 2009b; Kim *et al.* 2011; Xu *et al.* 2012b; Cao & Patisaul 2013), aunque el rol fisiológico de estas poblaciones se desconoce. Recientemente se descubrió que la población de neuronas *Kiss1* presentes en la MeA también se encuentra regulada por esteroides sexuales (Kim *et al.* 2011).

Por otro lado, estudios de expresión en rata sugieren la presencia de *Kiss1* y *Kiss1r*, así como sus péptidos en la hipófisis (Gutierrez-Pascual *et al.* 2007; Richard *et al.*

2008). Estos estudios demuestran que kisspeptina actúa directamente en la hipófisis estimulando la secreción de gonadotrofinas, principalmente LH.

También se demostró la presencia del sistema *Kiss1* en ovario de rata en diferentes estadios del desarrollo postnatal, a lo largo del ciclo y en respuesta a manipulaciones hormonales (Castellano *et al.* 2006), demostrando que *Kiss1* aumenta durante la transición puberal y tiene un pico de expresión en la tarde del proestro, previo a la ovulación, en este órgano. Además, su expresión parece estar regulada por gonadotrofinas (Castellano *et al.* 2006). Por lo tanto, el sistema *Kiss1* ovárico podría tener un rol local en el control de la ovulación, aunque su relevancia fisiológica no se conoce aún.

GNRH

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

El sistema nervioso central integra información proveniente de diversos lugares, tales como el eje reproductor, el medio externo o interno, y de esta manera controla la secreción pulsátil de GnRH, regulando así la función gonadotrófica.

El GnRH es un decapeptido, cuya estructura molecular presenta muy pocos cambios a lo largo de la evolución de los vertebrados, siendo el originalmente descrito en mamíferos: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (Schally *et al.* 1971).

Esta hormona, regulada por kisspeptina y por neurotransmisores excitatorios e inhibitorios, es liberada de manera pulsátil desde las terminales nerviosas en la EM y transportada por el sistema porta hipofisario a la *pars distalis*, estimulando la secreción de las hormonas hipofisarias LH y FSH. Ambas gonadotrofinas viajan a través de la circulación general hasta las gónadas donde ejercen su acción trófica, tanto endocrina como gametogénica. Los esteroides gonadales secretados por los ovarios, estradiol (E₂) y progesterona (P₄), principalmente, y por los testículos, testosterona (T) y dihidrotestosterona (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 progesterona (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

En contraste con otras neuronas hipotalámicas secretoras de péptidos, las neuronas de GnRH no forman núcleos bien definidos y son sólo unas 1000 a 2000 neuronas. Si bien las neuronas decapeptidérgicas tienen pulsatilidad intrínseca, el patrón pulsátil de secreción de GnRH, sugiere la existencia de una red de conexiones que permite sincronizar dichas neuronas (Stojilkovic *et al.* 1994). Surgió así el concepto de un *oscilador o generador de pulsos* ubicado en el HT responsable de la liberación pulsátil y sincrónica de GnRH desde las terminales nerviosas de neuronas decapeptidérgicas.

En roedores clásicamente se postulaba que la secreción de GnRH es controlada por dos centros ubicados en dos áreas distintas del HT. Por un lado, el centro tónico ubicado en el HMB (presente en ambos sexos), responsable de la secreción pulsátil. Y por otro lado, el centro cíclico: compuesto por el HA y el APO (presente sólo en hembras), responsable de la secreción cíclica. Ahora se postula que las neuronas *Kiss1* presentes en el ARC representarían el sustrato del generador de pulsos de GnRH, ya que kisspeptina se libera hacia la EM de manera intermitente con una frecuencia de un pulso por hora en monas (Keen *et al.* 2008). Sin embargo, los pacientes con mutaciones del *Kiss1r* exhiben liberación intermitente de LH de baja amplitud a una frecuencia normal (Seminara *et al.* 2003), por lo que kisspeptina funcionaría más bien amplificando la actividad del generador de pulsos en vez de generar la pulsatilidad. Si esto fuese así, al administrar de manera continua kisspeptina a la dosis a la cual el *Kiss1r* se internaliza, reduciría la amplitud de LH pero no la pulsatilidad y este no fue el caso en un trabajo realizado en monos, donde tanto la amplitud como la pulsatilidad de LH disminuyeron (Plant & Ramaswamy 2009). Por lo cual se requiere un mayor estudio para dilucidar el rol de kisspeptina sobre el generador de pulsos de GnRH.

La reproducción en mamíferos, tanto en machos como hembras, depende críticamente de una neurosecreción apropiada de GnRH. Esto ha sido demostrado en numerosos experimentos en los cuales el bloqueo de la secreción del decapeptido, por

anestésicos o barbitúricos, o de su acción por inmunoneutralización o antagonismo del receptor, llevan a un cese o reducción en la secreción gonadotrófica y de la función gonadal. La esterilidad en ratones mutantes, carentes de GnRH, o la infertilidad humana asociada a una insuficiencia de GnRH, como en el Síndrome de Kallman, demuestran las severas consecuencias reproductivas resultantes de una secreción de GnRH deficiente (Levine *et al.* 1991).

La liberación hipotalámica de GnRH está regulada por neuronas presentes en diferentes regiones del cerebro (sistemas límbico y olfatorio, corteza visual, etc.), cuyas terminales finalizan en el HT. Uno de los péptidos más importantes, recientemente descrito, que regulan positivamente la secreción de GnRH es la kisspeptina, como mencionáramos anteriormente. Además existen neurotransmisores que participan en este control, entre los cuales se encuentran: el GABA y péptidos opioides endógenos que son inhibitorios de la liberación de GnRH; la epinefrina, norepinefrina, neuropéptido Y y glutamato que la incrementan, mientras que dopamina y serotonina pueden ser inhibitorias o estimuladoras dependiendo del estado endocrino 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.

AMINOÁCIDOS

Muchas de las acciones neuroendocrinas son controladas por factores que son neurotransmisores en sí mismos, como el GABA, el glutamato, la norepinefrina y la dopamina, entre muchos otros. Se ha demostrado que de todos estos factores regulatorios, los primeros en ejercer este control durante el desarrollo son GABA y glutamato. En esta tesis nos centraremos en el estudio principalmente del GABA como un factor capaz de regular múltiples funciones endocrinas y uno de los principales reguladores de las neuronas que secretan GnRH.

EL ÁCIDO GAMMA 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, y participa en, al menos, 40 / de las sinapsis inhibitorias. Además, es indispensable para el control de una variedad de funciones como la actividad locomotora, el aprendizaje y los ritmos circadianos (Krnjevic 2004; Bowery & Smart 2006). Se sabe que el GABA, además de neurotransmisor y metabolito, también actúa como neurohormona (molécula de señalización paracrina) y como neurotrofina para las neuronas en diferenciación, ya que modula la proliferación de los progenitores neurales, promueve y regula la migración de los precursores neuronales y acelera la maduración neuronal, jugando así un rol morfogenético durante el desarrollo embrionario (Varju *et al.* 2001; Lujan *et al.* 2005; Bowery & Smart 2006).

Metabolismo del 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 tiene 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 dos isoformas de GAD (GAD₆₅ y GAD₆₇) en las neuronas GABAérgicas de los vertebrados, codificadas por genes distintos, las que difieren en sus propiedades cinéticas, distribución intracelular y en sus interacciones con el cofactor piridoxal-fosfato. Además, se sabe que GAD₆₇ predomina en ratón, mientras que GAD₆₅ es la isoforma predominante en rata y humano (Sheikh *et al.* 1999).

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).

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

Se describió la presencia de GABA y GAD también en ovarios, testículos, trompas de Falopio, hipófisis, riñón, glándulas adrenales y células β del páncreas productoras de insulina (Paulsen *et al.* 1988). Aunque la función específica del GABA en algunos de estos tejidos y tipos celulares no ha sido totalmente caracterizada.

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). Éstos se han clasificado sobre la base de sus distintas propiedades farmacológicas, fisiológicas y moleculares (Chebib & Johnston 1999). Hoy en día, en general se acepta que los receptores GABA_A y GABA_C pertenecen a un mismo grupo.

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 & Olsen 1994; Bormann & 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

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. Están compuestos por cinco subunidades, con 4 dominios transmembrana cada una, que conforman un canal de cloruro (Cl⁻). Las regiones carboxi- y amino- terminales son extracelulares y parte del sitio de unión a agonistas / antagonistas yace dentro de la región amino- terminal (Chebib & Johnston 1999). Sin embargo, mientras los RGABA_A son hetero-oligómeros compuestos por una mezcla de las subunidades (Rudolph *et al.* 2001), los RGABA_C son homo- o hetero-oligómeros formados por combinación de isoformas de una única subunidad (Chebib & Johnston 1999).

Características de los receptores GABA_B

Dado que en este trabajo nos centraremos en los efectos de los receptores GABA_B sobre la reproducción y que como modelo experimental utilizaremos ratones que carecen de la expresión de un RGABA_B funcional, a continuación se detallan las características más sobresalientes de estos receptores.

En 1980, Bowery y col. describieron y caracterizaron un receptor GABA farmacológicamente distinto al receptor GABA_A (Bowery *et al.* 1980; Hill & Bowery 1981), denominado RGABA_B. Estos receptores 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 (Figura 6).

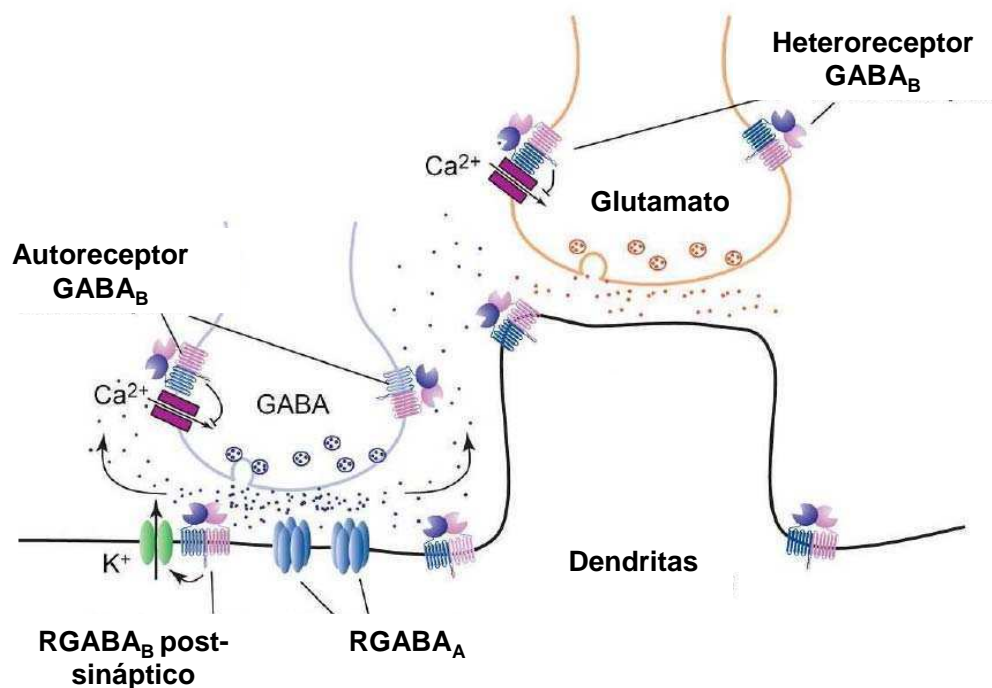


Figura 6. Localización de los RGABA_B en el cerebro. Si el RGABA_B se encuentra en terminales GABAérgicas se lo denomina autoreceptor y si se encuentra en otras terminales nerviosas, heteroreceptor. Modificado de J. Cryan (Cryan & Kaupmann 2005).

Aunque los RGABA_B se expresan abundantemente en el SNC de mamíferos y se conoce de su existencia desde 1980 (Bowery *et al.* 1980; Hill & Bowery 1981), su estructura permaneció sin ser elucidada 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 amino-terminal, donde los primeros 147 aminoácidos del RGABA_{B(1a)} (Masa molecular (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 presentan una estructura molecular característica de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), con siete dominios transmembrana (Blein *et al.* 2000; Bowery *et al.* 2002; Bettler *et al.* 2004).

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; Jones *et al.* 1998; White *et al.* 1998; Kuner *et al.* 1999; Schuler *et al.* 2001; Prosser *et al.* 2001) (Figura 7).

Si bien el sitio de unión para ligandos, agonistas y antagonistas está en el dominio extracelular amino-terminal de la subunidad RGABA_{B1}, en la activación del receptor dependiente de agonista (cuya unión requiere del ión Ca²⁺) también participa el dominio amino-terminal de RGABA_{B2} (Galvez *et al.* 2000; Okamoto *et al.* 1998) (Figura 7). Por otro lado, la subunidad RGABA_{B2} es crucial para el acople con los efectores intracelulares (Figura 7) y necesaria para el correcto tráfico de RGABA_{B1} a la membrana plasmática (Duthey *et al.* 2002). El RGABA_B es el único ejemplo conocido donde dos GPCR aparentemente no funcionales se dimerizan y originan un receptor funcional (Jordan & Devi 1999). Posteriormente se identificaron cinco isoformas adicionales de variantes de *splicing* de RGABA_{B1}: RGABA_{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 $RGABA_{B(1c)}$ en ambos lugares mientras que las subunidades $RGABA_{B(1d)}$ y $RGABA_{B(1e)}$ lo hacen principalmente en tejidos periféricos.

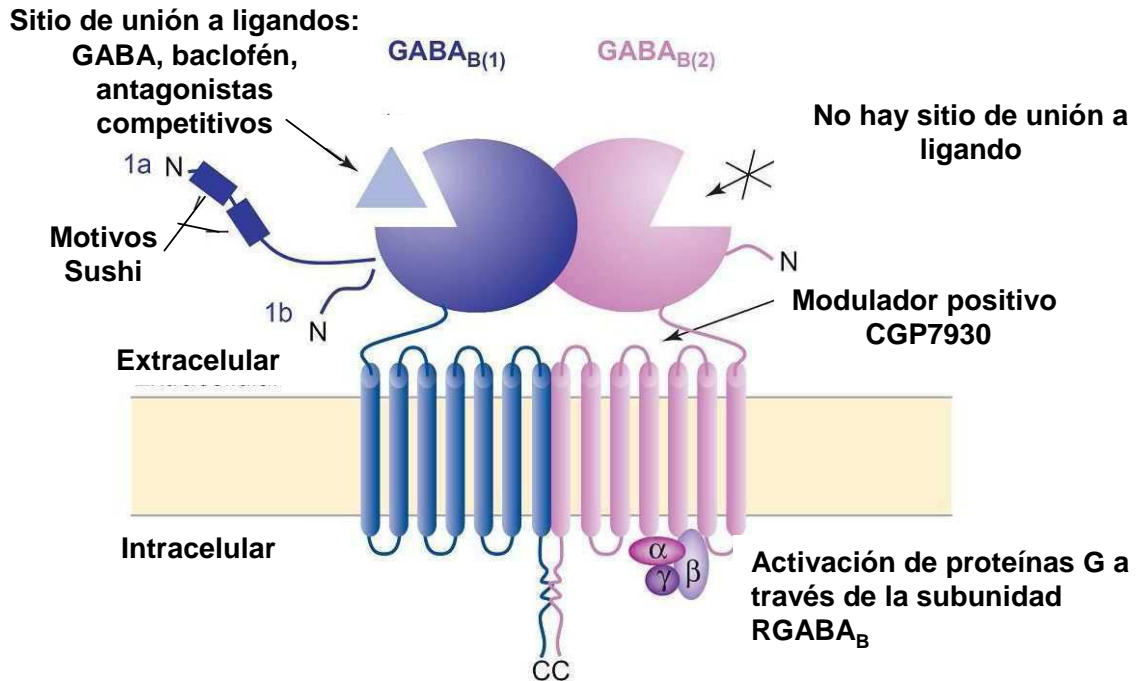


Figura 7. Asociación heterodimérica del $RGABA_B$ que le confiere funcionalidad. Las dos isoformas del $RGABA_{B1}$ ($RGABA_{B1a}$ y $RGABA_{B1b}$) difieren en el extremo N-terminal. La subunidad $RGABA_{B1}$ presenta el sitio de unión al ligando y la $RGABA_{B2}$ es la que se acopla a proteínas G. Modificado de J Cryan (Cryan & Kaupmann 2005).

Sin embargo, las respuestas de las dos subunidades recombinantes del receptor no comparten las mismas características cinéticas y respuestas que los receptores nativos. Por ejemplo, existen diferencias en la potencia de los agonistas entre las distintas poblaciones de los $RGABA_B$ nativos y entre los nativos y recombinantes. Para explicar estas discrepancias, se propuso la existencia de fosforilación diferencial del receptor, regulación de las proteínas G o distintas subunidades de efectores que modifiquen la respuesta de los receptores. Recientemente, se descubrió la existencia de cuatro proteínas citosólicas de la familia KCTD (proteínas que contienen dominios de tetramerización del canal de K^+) que son proteínas auxiliares de los $RGABA_B$ nativos (Gassmann & Bettler 2012). KCTD8, KCTD12, KCTD 12b y KCTD16 poseen distintos patrones de expresión en el cerebro y se unen al extremo carboxi-terminal de la subunidad $RGABA_{B2}$ como homo o hetero tetrámeros, formando un complejo estable y modulando las propiedades del $RGABA_B$. El descubrimiento de estas proteínas

auxiliares de los RGABA_B provee nuevas interacciones entre la funcionalidad del receptor y ciertas enfermedades. Por ejemplo, se sabe que el gen que codifica para KCTD16 es clave para el síndrome de epilepsia parcial congénita (Gassmann & Bettler 2012).

Los estudios con ratones carentes de la expresión de la subunidad RGABA_{B2} (GABA_{B2}KO) 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 carentes de la expresión de la subunidad RGABA_{B1} (GABA_{B1}KO) indican que esta subunidad es absolutamente esencial para un RGABA_B funcional (Schuler *et al.* 2001).

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 otras proteínas G como por ejemplo la G_q (Blein *et al.* 2000; Kaupmann *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 & 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).

Existen distintos agonistas del RGABA_B, entre los que se encuentran el Baclofen (β -[4-clorofenil] GABA), 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).

Entre los antagonistas de estos receptores encontramos al faclofen, saclofen y 2-hidroxisaclofen y el CGP55845, entre otros. Estos agentes mejoran el rendimiento cognitivo y pueden tener actividades antidepresivas y antipsicóticas además de propiedades neuroprotectoras (Bowery *et al.* 2002).

REGULACIÓN GABAÉRGICA DEL EJE GONADOTRÓFICO

Como mencionáramos anteriormente, la regulación del eje gonadotrófico es provista por señales tanto estimuladoras como inhibitorias transmitidas por diversos componentes como los neurotransmisores, las neurohormonas y las hormonas peptídicas y esteroideas. En relación a los neurotransmisores involucrados en estas funciones, se describió que el GABA tiene una importante y relevante función en dicho eje (Mitsushima *et al.* 1994; Heger *et al.* 2003; Mitsushima *et al.* 2003; Fujioka *et al.* 2007; Christian & Moenter 2007). El GABA puede regular este eje al actuar en todos los niveles: cerebral, hipofisario y gonadal, y esto está mediado por la unión a sus receptores específicos GABA_{A/C} y/o GABA_B.

En cuanto a la regulación GABAérgica a nivel cerebral, su efecto puede ser tanto directo sobre las neuronas GnRH como indirecto a través de interneuronas. El efecto directo es posible ya que se demostró que axones que contienen GAD hacen sinapsis con neuronas GnRH en el APO media en la rata (Leranth *et al.* 1985), las cuales presentan RGABA_A y RGABA_B (Lagrange *et al.* 1996; Sliwowska *et al.* 2006; Garyfallou *et al.* 2006). Por otro lado, la acción de GABA también puede ejercerse en forma indirecta, es decir por la interacción con interneuronas involucradas en la secreción de GnRH, como son las del sistema opioide, noradrenérgico, glutamatérgico, entre otros (Kalra & Kalra 1981; Donoso *et al.* 1994).

Otros estudios demuestran una relación aún más íntima entre GnRH y GABA. Se propuso que GABA estaría involucrado en la regulación de neurogénesis, migración y desarrollo del sistema nervioso (Tobet *et al.* 1996). Con respecto al efecto de GABA sobre la migración de neuronas GnRH, se han descrito tanto efectos estimuladores como inhibitorios actuando sobre el RGABA_A, dependiendo del modelo utilizado (Behar *et al.* 1996). Algunos autores sugieren que el GABA estaría involucrado en la correcta migración embriogénica de neuronas GnRH a través del *septum* nasal y la placa cribiforme hacia el cerebro, siendo necesaria esta migración para que las

neuronas encuentren su destino final, principalmente en el APO-HA-HMB (Schwanzel-Fukuda 1999; Wray 2001; Tobet & Schwarting 2006). Esto se postularía dado que existe una subpoblación de neuronas olfatorias que produce GABA en etapas embrionarias tempranas y este neurotransmisor podría estar regulando la migración de las neuronas de GnRH. Cuando estas neuronas llegan a su destino final cesa la producción de GABA (Fueshko *et al.* 1998a; Bless *et al.* 2000), siendo éste un requisito para la correcta función reproductiva. Por lo tanto, la alteración de uno de los componentes del sistema GABAérgico podría ocasionar disturbios en el desarrollo normal de este sistema (Heger *et al.* 2003). Por otro lado, se describió recientemente que los RGABA_B participan en la migración neuronal y posicionamiento durante la formación del VMN del hipotálamo, demostrando la importancia de estos receptores en el desarrollo por lo menos en algunos núcleo hipotalámicos (McClellan *et al.* 2008).

Durante la migración de las neuronas de GnRH, un subgrupo de ellas se aloja en los BO, ubicados en el telencéfalo. Los bulbos olfatorios son la principal estación de relevo de la vía olfatoria. Se ha propuesto que neuronas GnRH distribuidas en el sistema olfatorio participarían en el olfato y en la detección de feromonas en peces primitivos y mamíferos terrestres (Parhar 2002). En ratones de las praderas se ha observado presencia de cuerpos celulares y fibras inmunoreactivas para GnRH en el epitelio vomeronasal, los nervios vomeronasales y los BO accesorios (región dorsal posterior del bulbo olfatorio) tanto en neonatos como en adultos (Wirsig-Wiechmann & Wiechmann 2001). Es más, se ha propuesto que el GnRH del sistema olfatorio estaría involucrado en regular el comportamiento de lordosis en ratones hembra (Keller *et al.* 2006). Por otro lado es interesante también mencionar que se demostró la presencia de RGABA_B en neuronas del BO (Karpuk & Hayar 2008) y que se propone la participación de GABA a través de RGABA_A y RGABA_B en el procesamiento de la información olfatoria (Wilson & Laurent 2005).

En cuanto a la relación funcional entre el GABA y la liberación de GnRH existen opiniones controvertidas. Por un lado, se propuso que este efecto sería dual y estaría relacionado con el período de desarrollo. En este caso, el GABA tendría una acción estimuladora en los estadios tempranos del desarrollo e inhibitoria en los estadios tardíos del desarrollo y en la adultez (Grumbach 2002). Según esta teoría, se ha reportado que el sistema GABAérgico, a través de RGABA_A, estimula la secreción de

GnRH y LH durante el período prepuberal temprano en ratas hembras y tiene una acción inhibitoria sobre este eje en el período prepuberal tardío y en la adultez (Moguilevsky & Wuttke 2001).

Por otro lado, hay autores que postulan que el GABA tendría un efecto estimulatorio, por lo menos a nivel electrofisiológico, sobre las neuronas GnRH a través de $RGABA_A$ también en el adulto, dado que estas neuronas conservarían los canales iónicos típicos del estado inmaduro (Bilger *et al.* 2001; DeFazio *et al.* 2002; Heger *et al.* 2003).

Además, GABA 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, por inhibición de neuronas noradrenérgicas ubicadas en el HT, a través de ambos tipos de receptores ($RGABA_A$ y $RGABA_B$) (Adler & Crowley 1986; Hartman *et al.* 1990; Donoso *et al.* 1994). Respecto de los $RGABA_B$, más específicamente, Akema y Kimura propusieron que éstos estarían involucrados en la respuesta de LH a los estrógenos en ratas hembras castradas (Akema & Kimura 1991), mientras que otros autores les atribuyeron las diferencias sexuales en el aumento de gonadotrofinas post castración, junto a los $RGABA_A$ (Gay & Midgley, Jr. 1969; Luderer & Schwartz 1994).

Si bien el GABA es uno de los principales neurotransmisores que participa en la regulación del eje gonadotrófico, también existen otros relacionados al sistema GABAérgico, como el glutamato, aminoácido excitatorio de neuronas GnRH (Maffucci *et al.* 2008) cuyos efectos son ejercidos mediante canales NMDA. Los receptores para glutamato, ionotrópicos o metabotrópicos, fueron localizados en núcleos hipotalámicos críticos para las funciones neuroendocrina y reproductiva, y por tanto se propone que el glutamato cumple funciones fundamentales en el control de procesos tales como la pubertad, la pulsatilidad y el pico preovulatorio de gonadotrofinas, la conducta reproductiva y el envejecimiento (Otero Losada 1989; Brann & Mahesh 1997; Dhandapani & Brann 2000).

El glutamato así como también el aspartato, otro aminoácido excitatorio, se encuentran en altas concentraciones en varios núcleos hipotalámicos como el ARC, el supraquiasmático, el supraóptico, el paraventricular y en el APO.

El GABA también participa en la regulación de la secreción de GnRH a través de neuronas glutamatérgicas, ya que se sabe que existen RGABA_B en las presinapsis de estas neuronas, los cuales estarían inhibiendo la liberación de glutamato, pudiendo así también ejercer una disminución de la secreción del decapeptido y de las gonadotrofinas (Otero Losada 1989; Chu & Moenter 2005).

Además se sabe que la taurina, otro aminoácido inhibitorio, aumenta la actividad del sistema GABAérgico hipotalámico y de esta forma inhibe la liberación de GnRH y de LH en ratas hembra de 30 días posponiendo su maduración sexual (Arias *et al.* 1995). Se postula que la taurina sería agonista de los RGABA_A y RGABA_B (Belluzzi *et al.* 2004; del Olmo *et al.* 2000).

También hay autores que sugieren que los receptores para GnRH no sólo están presentes en las terminales axónicas en la EM, sino que también podrían encontrarse en neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y taurinérgicas, por lo que GnRH podría realizar una retroalimentación autoinhibitoria o estimuladora ultra corta de su propia secreción (Feleder *et al.* 1996). De este modo, la regulación de la secreción de GnRH se convierte en un complejo proceso en el que intervienen distintos factores estimulatorios e inhibitorios íntimamente relacionados.

Por otra parte, se ha demostrado la regulación GABAérgica del eje gonadotrófico a nivel hipofisario. En la hipófisis *per se* se demostró, por resultados de nuestro laboratorio entre otros, la presencia de los RGABA_A, RGABA_B y RGABA_C (Libertun *et al.* 1979; Fiszer de Plazas *et al.* 1982; Apud *et al.* 1987; Lux-Lantos *et al.* 1992; Gamel-Didelon *et al.* 2003; Mayerhofer *et al.* 2001). El GABA llegaría a la hipófisis por diferentes caminos desde el HT, además de existir una síntesis local, como lo demuestra la expresión de GAD en esta glándula (Vincent *et al.* 1982; Mayerhofer *et al.* 2001; Gamel-Didelon *et al.* 2002).

Resultados previos de nuestro laboratorio establecieron la participación de los RGABA_B en el control de la secreción hormonal hipofisaria (Lux-Lantos *et al.* 1992; Rey-Roldán *et al.* 1996), así como también sus mecanismos de señalización intracelular en la adenohipófisis (Lux-Lantos *et al.* 2001).

Al analizar las acciones directas del GABA sobre la secreción hipofisaria, se demostró un efecto estimulador sobre la liberación de LH y FSH en la hipófisis anterior a través de los RGABA_A (Anderson & Mitchell 1986; 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).

INTERACCIÓN ENTRE KISSPEPTINA Y GABA

Si bien la interacción de GABA y GnRH ha sido ampliamente estudiada, poco se conoce sobre la relación entre GABA y kisspeptina, aunque ambos factores juegan roles principales en la regulación del eje gonadotrófico. Además, la naturaleza de esta interacción depende de las condiciones experimentales y los receptores involucrados, ya que GABA puede ser excitatorio o inhibitorio sobre las neuronas GnRH, como mencionáramos anteriormente.

Varios grupos han sugerido que las neuronas de *Kiss1* y GABA interactúan en el control de la secreción de GnRH (Neal-Perry *et al.* 2009; Pielecka-Fortuna & Moenter 2010; Garcia-Galiano *et al.* 2012). En el despertar puberal el aumento de GnRH está asociado a una disminución de GABA seguida de un aumento de glutamato en la eminencia media y tallo hipofisario, indicando la crítica participación de GABA en este proceso (Richter & Terasawa 2001; Grumbach 2002). Por otro lado, se ha postulado que kisspeptina sería indispensable para el desarrollo puberal (Gottsch *et al.* 2006; Ojeda *et al.* 2006), por lo que una interacción entre estos dos sistemas parece probable. Esta hipótesis es avalada por algunas evidencias que sugieren que el efecto indirecto de kisspeptina sobre la liberación de GnRH sería mediado por neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas (Pielecka-Fortuna *et al.* 2008). Otros proponen un modelo en el que las neuronas de kisspeptina podrían estar reguladas por GABA (Ojeda *et al.* 2006). Herbison propone que las neuronas sensibles a estradiol aferentes a las neuronas de GnRH forman un *continuum* en el área rostral periventricular del tercer ventrículo, entre las que estarían las neuronas gabaérgicas y las kisspeptidérgicas (Herbison 2008). Además, Cravo y col. demostraron que un alto porcentaje de neuronas *Kiss1* del AVPV (75%) y del núcleo arcuato (50%) son también GABAérgicas (Cravo *et al.* 2011). Recientemente, Kurian y col. demostraron en monos

que antes del despertar puberal, y no después, la liberación de GnRH es inhibida por un *input* tónico de GABA a través de neuronas kisspeptidérgicas y que esta acción era ejercida por medio de RGABA_A (Kurian *et al.* 2012). Aunque se sabe que los RGABA_B son capaces de modular la secreción de GnRH, hasta el momento no se ha reportado una relación directa entre los RGABA_B y las neuronas kisspeptidérgicas. Sin embargo, se sabe que la activación de RGABA_B hiperpolariza las neuronas GnRH y que este efecto puede bloquearse con Kp-10, análogo sintético de kisspeptina (Zhang *et al.* 2009).

REGULACIÓN DEL CICLO OVÁRICO

CICLO OVÁRICO

En la mujer, en cada ciclo ovárico un folículo progresa a través de una serie de estadios de desarrollo (foliculogénesis) que incluyen: crecimiento y maduración, ovulación, formación del cuerpo lúteo y, en ausencia de fecundación, degeneración. La foliculogénesis es un proceso complejo, en el que múltiples interacciones endócrinas y parácrinas dentro del ovario, crean un cambio en el microambiente intrafolicular, para el apropiado desarrollo del oocito. En un principio, el oocito I es rodeado por células foliculares aplanadas y escamosas, formando el folículo primordial (a este estadio del oocito, frecuentemente se lo denomina vesícula germinal). Una cohorte de folículos primordiales es reclutada para iniciar su crecimiento, de la cual sólo un folículo, normalmente, será seleccionado para ser ovulado en los seres humanos. En los roedores este número varía entre 6 y 14 aproximadamente, dependiendo de la especie. El crecimiento del folículo primordial es independiente de las gonadotropinas y es influenciado principalmente por factores endócrinos/parácrinos (Knight & Glister 2003), muchos de ellos producidos por el propio oocito y por las células de granulosa que lo rodean.

Con el crecimiento continuo del folículo, las células escamosas se transforman en una capa cúbica simple, formando el folículo primario (Dumesic *et al.* 2008). Durante esta etapa aparece una sustancia amorfa llamada zona pelúcida, compuesta por diferentes glicoproteínas, que rodea al oocito separándolo de las células foliculares (Gartner L P & Hiatt J L 1997). Cuando el folículo primario ya ha sido activado para iniciar el desarrollo, se convierte en folículo pre-antral. Esta conversión incluye un

aumento considerable en su diámetro. Las células foliculares continúan proliferando formando la capa de granulosa. Células de la teca, provenientes del estroma circundante, se organizan alrededor del folículo en diferentes capas (Dumesic *et al.* 2008): una teca interna compuesta principalmente por una capa celular glandular muy vascularizada, y una teca externa de células planas y de naturaleza fibromuscular. A su vez, comienzan a desarrollarse varios espacios intercelulares dentro de las células de granulosa, llenos de líquido. Hacia el final del estadio pre-antral las células foliculares adquieren receptores para ciertas hormonas, las células de granulosa para estrógenos y FSH hipofisaria, mientras que las tecales desarrollan receptores para LH hipofisaria (Rice *et al.* 2007; Gougeon & Lefevre 1983). A partir de aquí, el desarrollo posterior de los folículos dependerá del estado endócrino del organismo en ese momento. Siempre que los niveles de FSH y LH circulantes sean adecuados, cualquier folículo con receptores apropiados entrará en el siguiente estadio del desarrollo, el antral. Los folículos pre-antrales que no poseen receptores hormonales experimentan un proceso de atresia es decir, degeneran y mueren.

Los espacios llenos de líquido, generados durante el estadio preantral, terminan coalesciendo formando una única cavidad llena de líquido denominada antro. A este estadio se lo conoce como folículo antral o secundario (Gartner L P & Hiatt J L 1997). Hacia el final de este estadio, el folículo es de mayor tamaño, aunque el oocito permanece más o menos con el mismo diámetro.

Bajo la influencia de las gonadotrofinas, las células del folículo antral comienzan a secretar grandes cantidades de hormonas. Bajo el estímulo de LH, las células de la teca interna sintetizan y secretan los andrógenos: testosterona y androstenediona. También producen pequeñas cantidades de estrógenos. Las células de granulosa, que poseen receptores para FSH, parecen responder a la presencia de esta hormona convirtiendo los andrógenos, que provienen de la teca, en estrógenos, en especial 17 β -estradiol, dado que la enzima conversora, la aromatasa, se encuentra principalmente en las células de la granulosa. El resultado final de esta actividad secretora es un aumento sustancial de los niveles circulantes tanto de andrógenos como de estrógenos. En las células de granulosa, los estrógenos actúan de forma autócrina estimulando la proliferación celular.

Hacia fines del estadio antral, las células de granulosa en respuesta a FSH y a estrógenos, adquieren receptores de LH. Cualquier folículo antral que no presente suficientes receptores de FSH y estrógenos experimentará atresia. Por consiguiente, durante la vida fértil de la mujer se desarrollan múltiples folículos primordiales, pero habitualmente sólo uno llega a la ovulación y será denominado folículo dominante.

En el estadio Pre-ovulatorio, LH estimula a las células de granulosa para sintetizar progesterona. A medida que aumenta la secreción de esta hormona, los estrógenos empiezan a disminuir ligeramente, y las células de granulosa pierden sus receptores para FSH y estrógenos (Pocock & Richards 2002).

Las células de granulosa se redistribuyen, de modo que el oocito I queda rodeado por un pequeño grupo de ellas que se proyectan desde la pared folicular hacia el antro. Esta estructura es conocida como *cumulus oophorus*. La única capa de células de granulosa que rodea al oocito se denomina *corona radiata*. Hacia el final de esta etapa, la teca interna y las células de granulosa son invadidas por capilares que nutren a ambas. Se forma así, el folículo maduro o de De Graaf (Gartner L P & Hiatt J L 1997). El oocito I completa la primera división meiótica convirtiéndose en oocito II. La meiosis se detiene de nuevo en metafase II, siendo ahora capaz de ser fertilizado e iniciar el desarrollo embriológico (Gougeon & Lefevre 1983; Dumesic *et al.* 2008). Al producirse un aumento súbito de los valores de LH circundantes se produce la ruptura del folículo, liberando al oocito II, en un proceso denominado ovulación que ocurre a mitad del ciclo menstrual. Con ello se completa la primera mitad del ciclo ovárico, conocida como Fase Folicular.

La segunda mitad del ciclo ovárico se la conoce como Fase Luteínica. En el folículo colapsado, las células foliculares aumentan de tamaño (se luteinizan) y se convierte en cuerpo lúteo. En caso de fecundación, éste será el responsable de mantener el equilibrio de las hormonas esteroideas que garanticen la implantación y el mantenimiento del embrión durante las primeras semanas de embarazo. Los niveles de progesterona aumentan de forma significativa y aproximadamente a mitad de la segunda fase del ciclo se observa un segundo pico de estrógenos. Si el oocito liberado en el momento de la ovulación no es fecundado, el cuerpo lúteo degenera en un proceso llamado luteólisis: las células luteinizadas colapsan, se produce isquemia y

muerte celular. Se genera entonces, una disminución en la secreción de estrógenos y progesterona. El cuerpo lúteo regresionado se conoce como cuerpo *albicans*.

CICLO ESTRAL

Tanto el ciclo menstrual de primates como el ciclo estral del resto de los mamíferos se divide en una etapa pre-ovulatoria y otra post ovulatoria. Entre ambas tiene lugar la ovulación, que en el caso de la rata y ratón ocurre espontáneamente. El ciclo estral del ratón se desarrolla en 4 ó 5 días, observándose un orden cronológico de 4 etapas de distinta duración: 1) Proestro: 12 a 14 horas, momento en que el animal entra en celo; 2) Estro: 25 a 27 horas, período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho, y es posible en la mayoría, aunque no en todos los mamíferos, un coito fecundante; 3) Diestro I (o metaestro): 6 a 8 horas; 4) Diestro II: 55 a 57 horas, período en el cual la secreción ovárica prepara los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito en estro.

El crecimiento y maduración de los folículos comprende los días de diestro y proestro, finalizando con la ovulación espontánea en la madrugada del estro (Smith y col. 1975; Greenway y Roy 1994). En cada fase del ciclo estral se suceden una serie de cambios característicos a nivel de ovario, útero, vagina, así como cambios comportamentales (Marcondes y col. 2002). En el ovario, durante las fases de proestro y estro temprano, un grupo de folículos ováricos completa la etapa de maduración, pero sólo una parte de este grupo termina ovulando, mientras que el resto sufre atresia. Tras la ovulación, los folículos que ovularon se transforman en cuerpos lúteos que crecen durante dos o tres días (fase de diestro) y luego degeneran lentamente. Se pueden encontrar así tres o cuatro generaciones de cuerpos lúteos en distintos estadios en cualquier fase del ciclo estral en roedores. En ausencia de gestación, el cuerpo lúteo degenera a la vez que otros folículos ováricos empiezan a madurar, iniciándose un nuevo ciclo. A nivel vaginal, se pueden determinar los distintos estadios del ciclo por observación al microscopio a bajo aumento, según los tipos celulares presentes en el extendido: en el proestro hay predominancia de células epiteliales nucleadas, redondas, ocasionalmente algunas escamosas; el día del estro, predominan las escamosas; durante los días de diestro 1 y 2 los leucocitos son mayoritarios.

REGULACIÓN DEL CICLO ESTRAL

En la Figura 8 se muestra la interacción entre el SNC y endócrino en la función reproductiva en la mujer.

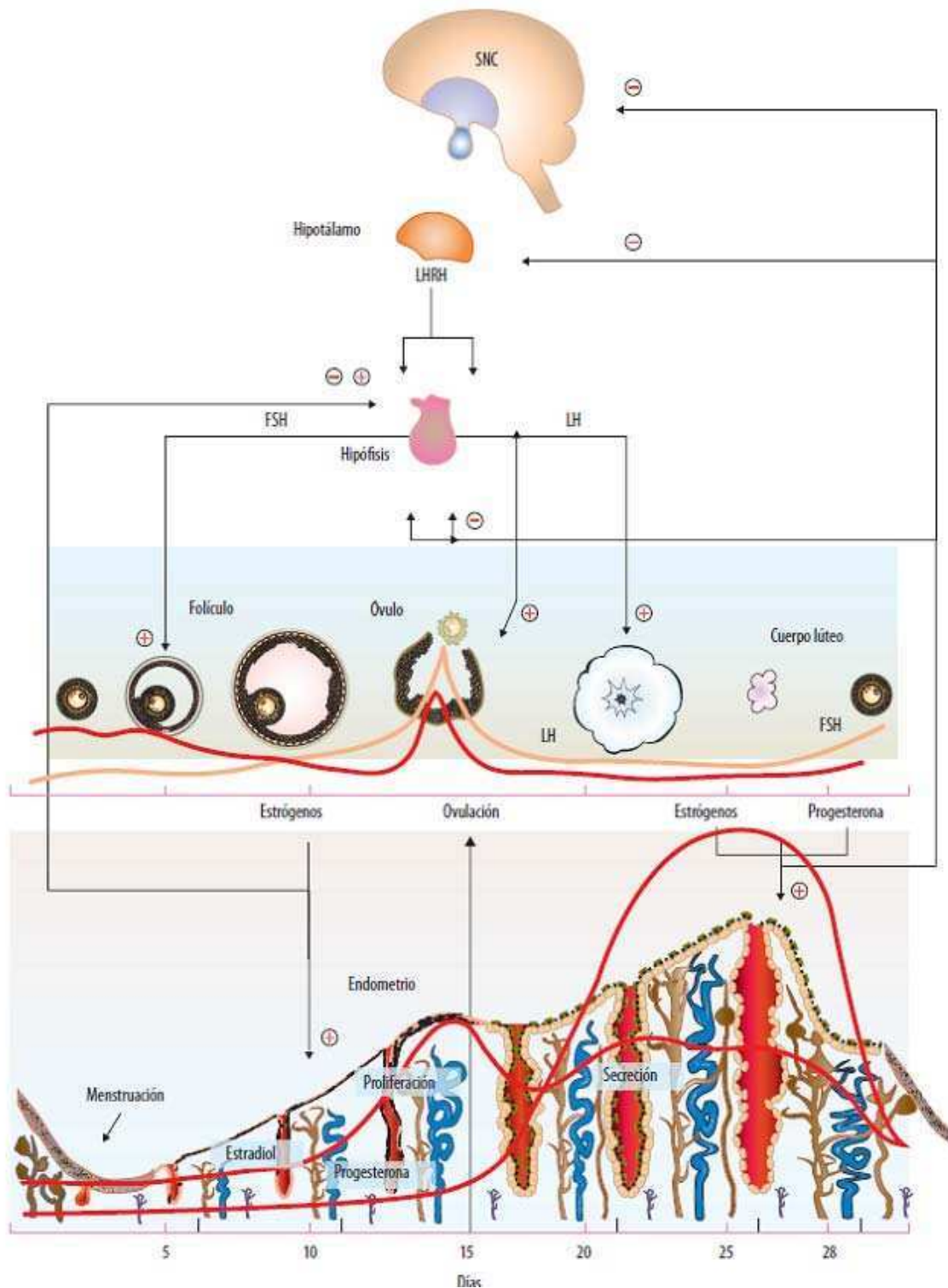


Figura 8. Esquema que muestra la interacción entre los distintos niveles del eje gonadotrófico (hipotálamo-hipófisis-ovario-útero) a lo largo del ciclo menstrual en la mujer. SNC: sistema nervioso central, LHRH: hormona liberadora de gonadotrofinas, LH: hormona luteinizante, FSH: hormona folículo estimulante. Tomado de J. Tresguerres (Tresguerres 1992)

Existen tres niveles de regulación de la función reproductiva de la hembra: a. El SNC, principalmente mediante la secreción hipotalámica de kisspeptinas y GnRH; b. La

adenohipófisis, a través de las gonadotropinas, LH y FSH; y de PRL (hormona luteotrófica en roedores); c. Los ovarios que, como se ha mencionado antes, secretan hormonas esteroides (estradiol y progesterona fundamentalmente y también testosterona) y hormonas proteicas (como la inhibina). La interacción de estos tres niveles de secreción y regulación hormonal da origen a los ciclos ovulatorios en las distintas especies.

Las variaciones en los niveles de gonadotropinas y esteroides sexuales durante el ciclo estral de la rata tienen gran semejanza con las variaciones observadas en los seres humanos y se muestran en la Figura 9.

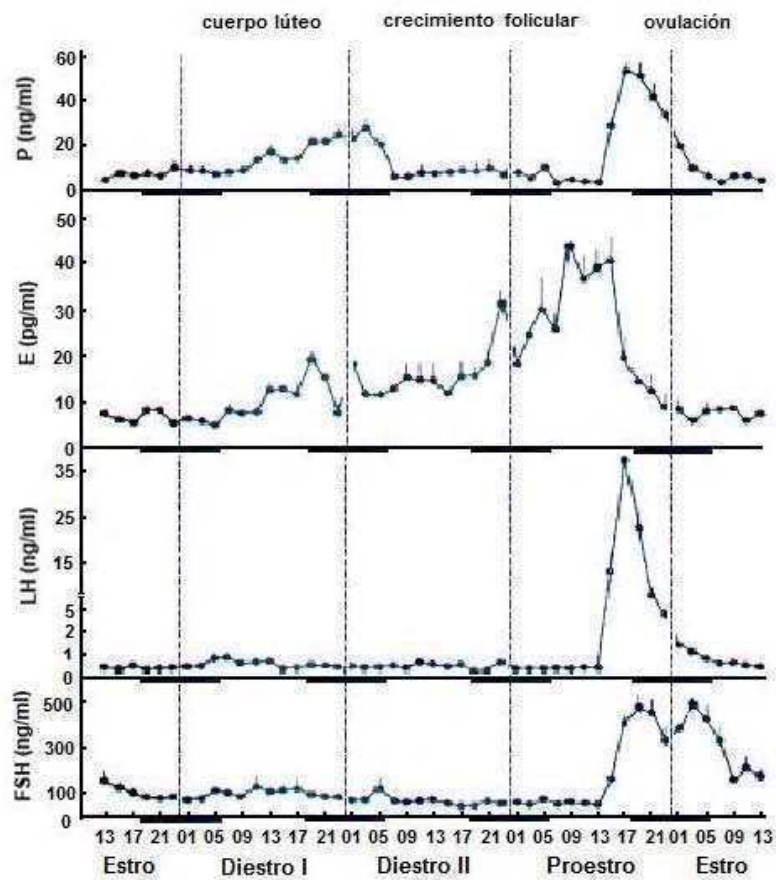


Figura 9. Variaciones hormonales a lo largo del ciclo estral de la rata. E: estradiol, P: progesterona, LH: hormona luteinizante, FSH: hormona foliculo estimulante. Los trazos oscuros representan el período de oscuridad del ciclo diario. Modificado de M. Smith (Smith *et al.* 1975).

La epilepsia es una enfermedad crónica, originada en la sustancia gris cerebral, caracterizada por uno o varios trastornos neurológicos que tienen en común la existencia de episodios repentinos y transitorios de descargas anormales y sincrónicas de un punto del SNC con o sin pérdida de la conciencia. Se generan convulsiones recurrentes que suelen dar lugar a consecuencias neurobiológicas, cognitivas y psicológicas.

Una de las principales causas de las convulsiones es la alteración de la actividad eléctrica inhibitoria en el cerebro. El GABA, como mencionáramos, principal neurotransmisor inhibitorio del SNC en mamíferos adultos, actúa en las sinapsis inhibitorias en el cerebro uniéndose a sus receptores.

En particular, el $RGABA_A$ es el receptor inhibitorio más importante y en la clínica se usa como receptor blanco de drogas anti-epilépticas: agonistas de $RGABA_A$, como los barbitúricos y las benzodiazepinas. Además, se sabe que la estructura y expresión de las subunidades que componen los $RGABA_A$ están íntimamente relacionadas con la epilepsia (Li & Liu 2012; Yalcin 2012). Por ejemplo, se demostró que mutaciones en el residuo lisina de la subunidad $\alpha 1$ del $RGABA_A$, involucrado en la apertura del canal del receptor, reduce la sensibilidad a GABA. Además, cada subunidad del $RGABA_A$ posee una distribución particular. Las convulsiones pueden inducir cambios en la composición del $RGABA_A$ en el cerebro adulto y patrones variables de distribución y expresión se asocian con distintos tipos de epilepsia (Li & Liu 2012). Por ejemplo, existe un aumento en la expresión de la subunidad $\alpha 1$ del $RGABA_A$ en la amígdala basolateral en epilepsia inducida por ácido kaínico.

Por otro lado, los modelos de ratón que poseen delección de las subunidades $RGABA_{B1}$ y $RGABA_{B2}$ presentan epilepsia, indicando un posible rol de éstos en la enfermedad (Schuler *et al.* 2001; Gassmann *et al.* 2004). Además, la expresión del ARNm de $RGABA_{B1}$ y sus niveles proteicos en la corteza cerebral y el hipocampo de ratas neonatas con convulsiones recurrentes disminuye significativamente, sugiriendo que los cambios en el $RGABA_{B1}$ podrían estar asociados con daño cerebral agudo (Bo *et al.* 2006). También se sabe que variantes genéticas del $RGABA_{B2}$ en humanos favorece

la epilepsia del lóbulo temporal (Wang *et al.* 2008) y además que pacientes con epilepsia poseen anticuerpos contra las subunidad RGABA_{B1} (Lancaster *et al.* 2010), corroborando el rol que tienen los RGABA_B en la actividad epiléptica.

Hasta aquí mencionamos el rol del sistema GABAérgico en la epilepsia. Sin embargo, también se sabe que las hormonas están involucradas en diversas formas de manifestación de epilepsia y en su tratamiento con drogas anti-epilépticas (Harden & Pennell 2013). Por ejemplo se sabe que los niveles séricos de PRL aumentan luego de un evento convulsivo y se usa como herramienta de diagnóstico para diferenciar convulsiones epilépticas de los eventos no epilépticos. El rol de las hormonas en la epilepsia es multidireccional e involucra muchos factores. Tanto el estradiol como la progesterona, principales hormonas reproductivas femeninas, afectan la excitabilidad neuronal. Se ha postulado que el estradiol estimula las convulsiones, pero este efecto depende de la dosis, la administración, el entorno hormonal, etc. Es así que las mujeres epilépticas podrían ser más susceptibles al efecto del estradiol durante el pico preovulatorio. Por otro lado, la progesterona promueve la neuroinhibición, a través de la alopregnenolona, la cual actúa como modulador de la conductancia de GABA, via RGABA_A los que tienen un sitio de unión para neuroesteroides.

En pacientes epilépticos se ha descrito un aumento en la tasa de síndrome de poliquistosis ovárico, disminución de la libido, infertilidad y menopausia temprana. Sin embargo, los efectos de la epilepsia sobre la actividad reproductiva central muchas veces se confunden con las alteraciones inducidas por las drogas anti-epilépticas sobre las hormonas reproductivas.

Regiones de la corteza límbica, particularmente la amígdala, poseen conexiones recíprocas con el hipotálamo y pueden modular el eje gonadotrófico. En pacientes con epilepsia se han encontrado alteraciones en la liberación de hormonas hipofisarias, debido a una disfunción de las neuronas hipotalámicas que secretan GnRH. En ratas hembra que generan convulsiones por inyección local de ácido kaínico en la amígdala, se evidenció una pérdida ipsilateral de fibras ir-GnRH en el hipotálamo. Además, según el lado de donde provienen las descargas se evidencian distintos desórdenes reproductivos. Las descargas del lado izquierdo del lóbulo temporal se asocian con

síndrome de ovario poliquístico, mientras que las del lado derecho con hipogonadismo hipogonadotrófico.

Por otro lado, las drogas anti-epilépticas que inducen enzimas metabólicas hepáticas, alteran directamente la concentración de las hormonas reproductivas, induciendo la producción de proteínas de unión a hormonas sexuales, provocando la reducción de la hormona biológicamente activa (libre) en suero.

Es importante, debido a estos antecedentes, caracterizar el efecto de la epilepsia y el uso de drogas anti-epilépticas a largo plazo sobre la función reproductiva y considerar que ello también puede implicar alteraciones por fuera del eje reproductivo, asociadas a habilidades cognitivas, así como también a estados de ansiedad en pacientes con epilepsia.

MODELO DE ESTUDIO: RATONES CARENTES DE LA EXPRESIÓN DEL RGABA_B FUNCIONAL (GABA_{B1}KO)

En el año 2001, el Dr. Bettler, con quien colaboramos, desarrolló ratones transgénicos de la cepa BALB/C en los que se indujo la falta de expresión de las dos isoformas (GABA_{B1a} y GABA_{B1b}) de la subunidad GABA_{B1} del RGABA_B (GABA_{B1}KO) (Schuler *et al.* 2001). En estos animales se observó presencia de epilepsia, hiperalgesia, memoria deficiente, actividad hiperlocomotora y falta de todas las respuestas típicas dependientes de los RGABA_B, tales como relajación muscular, hipotermia y ondas electroencefalográficas delta.

En el mismo año, Prosser y col. (Prosser *et al.* 2001) también desarrollaron un ratón con ausencia del RGABA_{B1} funcional pero en una cepa distinta (C57B16/J). Ellos demostraron que a pesar que el ratón deficiente en el RGABA_{B1} tenía apariencia normal al nacer, en la semana cuatro postnatal su crecimiento estaba retardado con respecto a sus pares salvajes y heterocigotas y presentaban un estado epiléptico generalizado que resultaba en muerte prematura, con una expectativa de vida de 21 días. Estos estados epilépticos se presentaban al mover la caja donde se encontraban los animales o con el simple manipuleo de los mismos y eran seguidos de un

comportamiento postictal depresivo. Además, al igual que el grupo del Dr. Bettler, observaron que se abolían todas las respuestas típicas de los RGABA_B.

Los resultados obtenidos por estos dos grupos de trabajo demuestran que la delección de la subunidad GABA_{B1} del RGABA_B es suficiente para abolir todas las funciones típicas de estos receptores.

En los trabajos realizados en nuestro laboratorio se habían utilizado herramientas farmacológicas clásicas (agonistas y antagonistas) para determinar la participación de los RGABA_B en el control neuroendocrino. A partir de la colaboración de nuestro laboratorio con el grupo del Dr. Bettler y gracias a su donación de tres parejas de ratones transgénicos heterocigotas, comenzamos a utilizar estos animales GABA_{B1}KO para la evaluación de la participación de estos receptores en la regulación neuroendocrina, haciendo hincapié en la unidad hipotálamo- hipófiso- gonadal, sin el inconveniente que implica la administración de drogas que además de su efecto específico pueden tener diversos efectos colaterales o secundarios.

Los primeros resultados de nuestros estudios sobre la participación de los RGABA_B en la regulación endocrina en animales GABA_{B1}KO mostraron que en ratones machos GABA_{B1}KO la prolactina (PRL) se encuentra elevada basalmente pero que no existen diferencias significativas en cuanto a la liberación de PRL inducida por estrés. Esto indicaría que los RGABA_B serían funcionales en este eje regulando la secreción basal de PRL (Catalano *et al.* 2005). Los ejes somatotróficos y tirotróficos no parecen estar alterados en los animales GABA_{B1}KO, al menos por los resultados obtenidos hasta el momento.

Por otro lado, demostramos que en ratones hembras GABA_{B1}KO existen alteraciones en los ciclos estrales (presentando largos períodos en estro y baja incidencia de proestros) y en la reproducción, como así también una respuesta alterada en el aumento de las gonadotrofinas frente a la castración, sin observarse diferencias en los niveles basales de éstas (Catalano *et al.* 2005). Si bien las hembras GABA_{B1}KO presentan alteraciones en los ciclos estrales, el comportamiento de apareamiento es normal una vez que están en proestro, ya que el porcentaje de tapón vaginal en la mañana del estro, índice de cópula, fue semejante al de las salvajes (WT). Por lo tanto el hecho que la fertilidad esté alterada se debe a un estadio posterior, que

aún no ha sido identificado, además de la baja frecuencia de proestros. Estas alteraciones observadas en las hembras GABA_{B1}KO son muy interesantes dado que en modelos de sobre-expresión de la enzima biosintética del GABA, GAD, también se observaron alteraciones del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico (Bilger *et al.* 2001; Heger *et al.* 2003), postulando un papel importante para el GABA en la ontogenia y fisiología del mismo. Además, dado que se postula que el GABA podría estar regulando la migración de las neuronas de GnRH hacia su destino final, el diencefalo, la falta del RGABA_B funcional en los animales transgénicos podría alterar el desarrollo normal del eje gonadotrófico.

Una cabal caracterización de la participación de los RGABA_B en la regulación neuroendocrina es importante no sólo por aportar al conocimiento integral de este eje sino porque puede ofrecer nuevos discernimientos de las causas de enfermedades reproductivas humanas de origen central sin etiología conocida, como las oligomenorreas o amenorreas hipotalámicas. Además, fármacos con acción sobre RGABA_B se están utilizando y/o evaluando para su uso en la clínica. Hoy en día, se utilizan agonistas para el tratamiento de la epilepsia, espasticidad, la rigidez muscular en patologías como lesión de médula espinal, la esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica o parálisis cerebral; también se utilizan para el tratamiento del dolor neuropático (Bettler & Tiao 2006). Además, se ha demostrado que los agonistas GABA_B disminuyen los síntomas del síndrome de abstinencia en programas para la rehabilitación de la drogadicción. Por otro lado, también se sabe que los antagonistas de los RGABA_B causan un efecto anti-depresivo y que este efecto es mediado via el sistema serotoninérgico y mediante factores neurotróficos, como el BDNF (Cryan & Slattery 2010). Por lo cual, estos pueden ser usados como una nueva clase de anti-depresivos utilizados en la clínica. Otro dato interesante del uso de antagonistas de RGABA_B es que recupera la deficiencia cognitiva y la plasticidad sináptica en un modelo de síndrome de down en ratón (Kleschevnikov *et al.* 2012), lo cual motiva el estudio del potencial terapéutico de estos compuestos en pacientes con este síndrome. Sin embargo, considerando el uso actual y futuro de agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos de los RGABA_B, poco se sabe de los efectos que éstos pueden causar en el entorno endocrino cuando su uso es crónico. En este sentido, el ratón GABA_{B1}KO ofrece la posibilidad de analizar los efectos de la falta del receptor GABA_B en el animal a lo largo de todos los estadios del desarrollo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El GABA, a través de sus RGABA_B, interactúa con GnRH y kisspeptina en la regulación del eje reproductivo en sus distintos niveles durante el desarrollo y en la adultez.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue investigar distintos aspectos del eje gonadotrófico y otras áreas extra-hipotalámicas relacionadas con la reproducción en ratones, WT y GABA_{B1}KO. Estudiamos la posible interacción entre GABA, a través de los RGABA_B, GnRH y kisspeptina en el control de la reproducción durante el desarrollo y en la adultez, comparativamente en ambos sexos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para poder verificar o refutar la hipótesis planteada en la presente Tesis Doctoral, nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el rol de los RGABA_B en ratones adultos GABA_{B1}KO evaluando la funcionalidad del eje gonadotrófico en sus distintos niveles: hipotálamo, hipófisis y gónadas.
2. Estudiar el rol de los RGABA_B en ratones adultos GABA_{B1}KO evaluando el sistema extra-hipotalámico de *Kiss1* en áreas relacionadas con la reproducción. Estudiar si las alteraciones encontradas en el sistema extra-hipotalámico de *Kiss1* se encuentran presentes en una edad pre-puberal o se ponen de manifiesto en la adultez.
3. Estudiar el rol de los RGABA_B en ratones de 4 días de edad de ambos sexos, WT y GABA_{B1}KO, estudiando la funcionalidad del eje gonadotrófico y evaluando si las alteraciones presentes en la adultez ya se encuentran establecidas en esta edad temprana del desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Todos los animales fueron alojados en racks con temperatura y ventilación controladas y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (7.00 a.m. a 7.00 p.m.). Tuvieron libre acceso a agua y alimento balanceado. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a los protocolos para el uso de animales de laboratorio, aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IBYME-CONICET), por el Comité de Ética del IBYME-CONICET que sigue los lineamientos del National Institute of Health (NIH, EEUU).

MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LA COLONIA GABA_{B1}KO

Ratones de la cepa endocriada BALB/C GABA_{B1}KO fueron generados mediante mutagénesis dirigida del gen de la subunidad GABA_{B1} del receptor en células germinales embrionarias (Dinkel *et al.* 1999). La estrategia para su generación consistió en introducir un inserto en la secuencia genómica normal de la subunidad GABA_{B1} de tal manera de alterar la normal expresión del receptor (Schuler *et al.* 2001). El gen que codifica para la subunidad B1 del receptor GABA_B posee un inserto que deletea los exones 7 a 10 de la secuencia WT, es decir se pierde parte del dominio de unión a GABA y el primer dominio transmembrana. Se genera a partir de este gen un mensajero truncado y la subunidad GABA_{B1} del receptor no trasloca a membrana, por lo cual hay ausencia de un receptor funcional.

Las células germinales embrionarias BALB/C heterocigotas para GABA_{B1} fueron inyectadas en blastocistos C57BL/6 y los machos quimera fueron cruzados con hembras BALB/C. Así se obtuvo la primera generación de ratones endocriados mutantes heterocigotas para el alelo mutante GABA_{B1}.

En primer lugar, se estableció una colonia de ratones GABA_{B1}KO en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, a partir de 3 parejas heterocigotas donadas gentilmente por el Dr. Bernhard Bettler (Universidad de Basilea, Suiza). Para el mantenimiento y propagación de la colonia se aparearon machos y hembras heterocigotas. Esta decisión se realizó basada en estudios previos del laboratorio en

donde se observó que el ciclo estral de las hembras GABA_{B1}KO estaba alterado con respecto a las WT, presentando periodos prolongados en estro y periodos breves en proestro (Catalano *et al.* 2005). Además, los parámetros de fertilidad de estas hembras también se encontraban alterados, dado que el número de hembras preñadas al cabo de 30 días de apareo estaba reducido con respecto a las hembras WT. Por lo tanto, debido a las alteraciones en los ciclos que presentan las hembras GABA_{B1}KO y sabiendo que los animales heterocigotas no presentan estas alteraciones, se decidió aparear animales heterocigotas y mantener los animales GABA_{B1}KO y sus controles WT para los estudios a realizar. Se registraron los días de nacimiento de las crías y éstas fueron destetadas a los 19-21 días posteriores a su nacimiento y separadas por sexo.

Dado los antecedentes mencionados anteriormente, las hembras adultas WT y GABA_{B1}KO utilizadas para la realización de los estudios de este capítulo fueron cicladas y sacrificadas en estro para poder realizar una mejor comparación entre ellas.

GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES GABA_{B1}KO

Con el objetivo de clasificar por genotipo a los animales se realizó la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico a partir de pequeños cortes en las falanges de los miembros superiores y/o inferiores de ratones neonatos, según un código interno utilizado para identificar a los animales, método tomado de literatura. Finalmente se llevó a cabo la genotipificación de los animales en edades tempranas (días dos o tres postnatal) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con *primers* específicos como se describió previamente (Catalano *et al.* 2005; Schuler *et al.* 2001).

EXTRACCIÓN DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN) GENÓMICO

A partir de los tejidos obtenidos para identificar a los ratones, se llevó a cabo la extracción de ADN para la posterior genotipificación. A los cortes se los colocó en tubos de 0.6 ml y se les agregó 100 µl de *buffer* de lisis (100 mM TRIS-ClH pH 8.5, 5 mM EDTA pH 8, 200 mM NaCl, 0.2 / SDS) y 2 µl de proteinasa K (10mg/ml; AppliChem). Luego se incubaron a 55°C durante 4 horas (con agitación cada 30 minutos). Si luego de la incubación aún quedaba tejido sin disolver, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 minutos y se transvasó obteniéndose el sobrenadante. Se agregaron a cada tubo 100 µl del reactivo fenol-cloroformo-isoamílico (PIC; 25:24:1) equilibrado en Tris-

CIH 0,1 M pH 8,0 (65 µl por ml de PIC) y 100 µl de *buffer* Tris-EDTA (TE) pH 8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Se agitaron y luego se centrifugaron durante 5 minutos a 12,000 rpm. Una vez centrifugados, se transvasó la fase acuosa a tubos de 1.5 ml y se les agregó 1 ml de etanol 100 / . Se mezclaron por inversión y se guardaron a -20°C durante 2 horas o a -70°C durante 30 minutos. Al cabo de ese tiempo, se centrifugaron 10 minutos a 12,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se les agregó 200 µl de etanol 70 / en agua y se agitaron nuevamente. Finalmente, se los centrifugó durante 5 minutos a 12,000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente durante una hora aproximadamente y luego se resuspendió en 20 µl de *buffer* TE pH 8.

Para realizar la cuantificación del ADN extraído, se realizó una dilución 1/50 en agua estéril y se cuantificó la dilución por espectrofotometría a 260 nm, evaluando su pureza mediante la relación de absorbancias 260 nm/280 nm, considerando aceptable en este último caso un valor igual o mayor a 1,8. Finalmente, se les agregó agua estéril a cada tubo para obtener una concentración final de 40 ng/µl. Las muestras de ADN purificadas se almacenaron a -20°C hasta su utilización en la PCR, con la cual se genotipificó a los animales.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y VISUALIZACIÓN EN GEL DE AGAROSA

Para la genotipificación se llevó a cabo la PCR con *primers* específicos que amplifican un fragmento de 0.7 kb en el ratón WT (secuencia ubicada entre los exones 10 y 11) y de 1.1 kb en el alelo GABA_{B1}KO correspondiente a la zona en la que se realizó la inserción disruptora de la transcripción del RGABA_{B1}, entre el inserto NEO y el exón 11 (Schuler *et al.* 2001) (Figura 1).

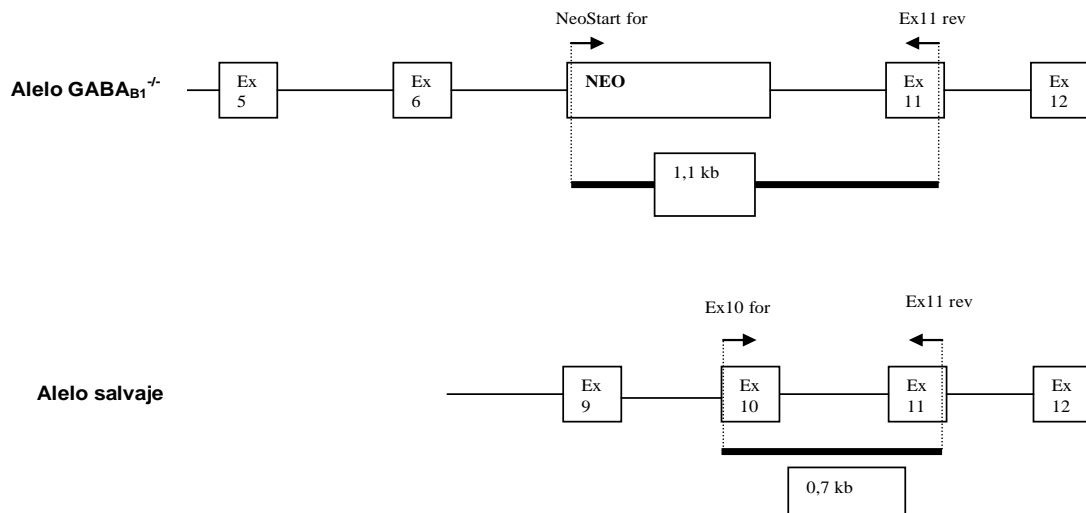


Figura 1: Esquema de los exones correspondientes al alelo WT y al GABA_{B1}KO, mostrando el lugar de apareamiento de los *primers* y el tamaño de producto que amplifican en cada caso.

Los *primers* utilizados presentan la siguiente secuencia (Invitrogen, EEUU):

Neo Start for: 5'- ATG GGA TCG GCC ATT GAA CAA- 3' (específico del alelo GABA_{B1}KO)

Ex 10 for: 5'- AGC TGA CCA GAC CTT GGT CAT- 3' (específico del alelo WT)

Ex 11 re: 5'- AAC TGG CTT CTC CCT ATG TGG- 3'

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l con los siguientes reactivos: 0.2 μ l de Taq polimerasa Platinum[®] (5U/ μ l; Invitrogen, EEUU), 2.5 μ l de *buffer* 10X (Invitrogen, EEUU), 0.4 μ l de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM (Invitrogen, EEUU), 1 μ l de Mg²⁺ 50 mM, 0.25 μ l de Ex 11 re, 0.25 μ l de Ex 10 for (alelo WT) y 0.28 μ l de Neo Start for (alelo GABA_{B1}KO) 25 μ M, 2 μ l de muestra a genotipificar (40 ng/ μ l) y se completó hasta el volumen final con agua estéril.

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: activación de la enzima a 95 $^{\circ}$ C durante 5 minutos (1 ciclo), desnaturalización a 95 $^{\circ}$ C 1 minuto- apareamiento a 57 $^{\circ}$ C 1 minuto- elongación a 72 $^{\circ}$ C 2 minutos (39 ciclos) y elongación final a 72 $^{\circ}$ C 10 minutos (1 ciclo).

A los tubos con los productos de PCR se les agregó 3 μ l de *buffer* de siembra (3.75 mg bromofenol blue, 450 μ l de glicerol y 1050 μ l de *buffer* TE pH 8) y 1 μ l de SYBR[®] GREEN 10 X (dilución 1/1000 en dimetilsulfóxido; Molecular Probes, Oregon, EEUU).

Finalmente se analizó el genotipo de los animales sembrando 13 µl de cada muestra en un gel de agarosa 1% en buffer Tris base 45 mM-Borato de Sodio 45 mM-EDTA 1 mM pH 8,0 (TBE 0.5%) con marcadores de peso molecular. La corrida se realizó a 90 Volts durante 1 hora aproximadamente y luego se visualizó en un G-Box (SynGene) por exposición a la luz ultravioleta.

A continuación se muestra un gel representativo en donde se pueden observar las bandas correspondientes a los genotipos de los animales (Figura 2).

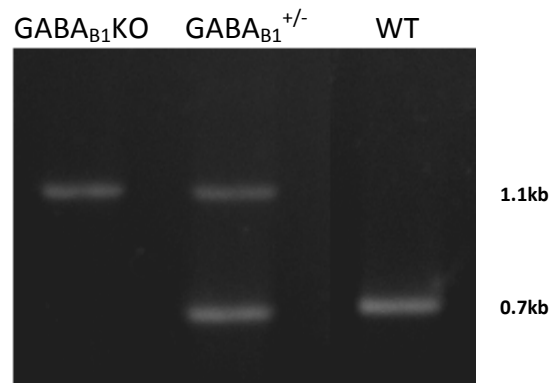


Figura 2: Gel de agarosa 1% en TBE 0,5%, utilizando SYBR green para la visualización de las bandas: bandas correspondientes a productos de amplificación mediante PCR de muestras de ADN genómico de ratones. Las bandas correspondientes al alelo WT poseen un tamaño de 0,7 kb, mientras que las correspondientes al alelo GABA_{B1}KO poseen un tamaño de 1,1 kb.

EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS Y LOCALIZACIÓN NEURONAL MEDIANTE HIBRIDIZACIÓN IN SITU (HIS)

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Ratones adultos (3-5 meses, hembras en estro) y de 14 días de edad (DPN14, día de nacimiento: DPN1) de ambos sexos y genotipos (WT y GABA_{B1}KO) fueron sacrificados durante la mañana e inmediatamente se retiró con cuidado el cerebro, se lo congeló sobre hielo seco y se guardó posteriormente a -80 C hasta la realización de los cortes. Se cortaron series coronales de cerebro de 20µm en el crióstato, se montaron sobre portaobjetos Superfrost-plus y se guardaron a -80 C hasta la HIS.

DISEÑO, CUANTIFICACIÓN Y MARCACIÓN CON ³³P DE SONDAS PARA HIS

La sonda de ARNc *Kiss1* (Facilitada por el Dr. Kauffman) fue clonada a partir de ADNc de hipotálamo de ratón adulto en un plásmido de transcripción pBluscript II SK(-) (Stratagene, La Jolla, CA) entre los sitios de restricción de *HindIII* y *KpnI*, y las sondas

antisentido se transcribieron con la polimerasa T7, como fue descrito previamente (Semaan *et al.* 2010; Semaan *et al.* 2012).

La sonda de ARNc *Gnrh1* (Facilitada por el Dr. Kauffman) fue clonada como se describió previamente (Finn *et al.* 1998).

La sonda de ARNc *RGABA_{B1}* (GenBank NM_001177511) se diseñó para que se una a las bases 385-856 del ARNm de la subunidad *GABA_{B1}* del *RGABA_B*.

Para la marcación de las sondas con ³³P se utilizó el protocolo estandarizado en el laboratorio del Dr. Kauffman. Brevemente, el ³³P (25ul, 250uCi por tubo) se seca en un concentrador *Speed Vac* durante 30 min. A cada tubo se le agrega 9ul de H₂O DEPC, 4ul de buffer de transcripción 5X, 1ul de inhibidor de ARNasa, 2ul de 3NTPs, 1,5ug de la sonda y por último 2ul de polimerasa T7. Se le da al tubo un pequeño vórtex y spin y se coloca en un baño a 37°C durante 120 min. Luego de ese tiempo, se le agrega 1ul de polimerasa T7, nuevamente se da un vórtex y spin y se coloca en baño a 37°C por 60 min. Al cabo de ese tiempo se le agrega 2 ul de ADNasa, se da un vórtex y spin y se coloca nuevamente en el baño durante 20 min. Al cabo de ese tiempo se coloca el tubo en hielo, se agrega 3ul de EDTA y luego 25ul de H₂O DEPC, se mezcla y se deja en hielo. La sonda radiactiva se coloca en la columna *Probe Quant G50 micro columns* (Amersham GE). Se centrifuga a 3g durante 2 min., se recoge el líquido donde se encuentra la sonda marcada y se guarda a -80°C hasta su cuantificación.

Para la cuantificación de las sondas se realiza una dilución 1:50 en H₂O DEPC y se coloca 1ul de esa dilución en un tubo con líquido de centelleo y se cuantifica por duplicado en un contador de rayos β, se requiere de aprox. 170.000-200.000 cpm.

HIS MARCACIÓN SIMPLE

Se realizaron ensayos de HIS de marcación simple para *Kiss1* y se realizó la cuantificación en AVPV/PeN, ARC, MeA, BNST y *septum lateral*, en ratones adultos y DPN14. También se realizaron ensayos de HIS para GnRH y se cuantificó en APO, únicamente en ratones adultos.

HIS de marcación simple fue realizada como se describió previamente (Semaan *et al.* 2010; Semaan *et al.* 2012). Brevemente, las secciones fueron fijadas en paraformaldehído 4%, pre-tratadas con ácido acético anhidro, lavadas en SSC 2X

(citrato de sodio-cloruro de sodio), luego en cloroformo, finalmente en etanoles y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las sondas antisentido marcadas radiactivamente (^{33}P) de *Kiss1* o GnRH (0.04 pmol/ml) se combinaron con ARNt, se desnaturalizaron con calor, se les agregó buffer de hibridización y se aplicó 100 μl a cada portaobjeto. Estos fueron cubiertos con cubreobjetos y se colocaron en una cámara húmeda a 55 C durante la noche. Al día siguiente, fueron lavados en SSC 4X y colocados en un tratamiento con ARNasa A a 37 C durante 30 min. Luego se colocaron en un buffer sin ARNasa a 37 C durante 30 min. Luego del lavado con SSC 2X a temperatura ambiente, se lavaron con SSC 0.1X a 62 C durante una hora, se pasaron por alcoholes y se dejaron secar a temperatura ambiente. Luego se sumergieron en una emulsión Kodak NTB (Eastman Kodak, Rochester, NY), se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron a 4 C durante 3 a 4 días (dependiendo del ensayo) antes de ser revelados y montados. No se detectaron marcas positivas en los controles negativos con sondas sentido.

HIS MARCACIÓN DOBLE

Se realizó HIS de marcación doble para evaluar la expresión del RGABA_{B1} en las neuronas *Kiss1*. Esto se realizó únicamente en hembras adultas (sacrificadas en estro) y se evaluó la co-localización de ambos mensajeros en la población de neuronas *Kiss1* del AVPV/PeN y ARC.

Para la HIS de marcación doble se utilizó el protocolo previamente descrito (Robertson *et al.* 2009; Semaan *et al.* 2010), en el cuál se utilizaron una sonda antisentido de *Kiss1* marcada con digoxigenina (DIG) y una sonda antisentido de RGABA_{B1} marcada con fósforo radiactivo (^{33}P) (GenBank NM_001177511).

Brevemente, las secciones fueron tratadas de manera similar a la HIS de marcación simple con las siguientes modificaciones, descritas previamente (Poling *et al.* 2012). Las sondas antisentido de *Kiss1* marcadas con DIG fueron sintetizadas con el Kit DIG Labelling Mix (Roche). Las sondas antisentido de RGABA_{B1} (0.05 pmol/ml) marcadas con ^{33}P y las sondas antisentido de *Kiss1* marcadas con DIG (1:500) fueron combinadas con tRNA, desnaturalizadas por calor y disueltas en un *buffer* de hibridización. La mezcla con ambas sondas se aplicó sobre cada portaobjeto (100 μl /portaobjeto) y luego fueron hibridizadas a 55 C durante toda la noche. Luego de los lavados a 62 C del segundo día, los cortes fueron incubados a 21 C durante toda la noche con el

anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (Roche; diluido 1:500 en *Buffer 1* conteniendo suero normal de oveja 1/ y Triton X-100 0.3/). Posteriormente, los cortes se lavaron con *Buffer 1* y se incubaron durante 1 hora con el sustrato de la fosfatasa alcalina Vector Red (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a 21 C. Luego, se secaron a temperatura ambiente, se sumergieron en la emulsión reveladora, se guardaron a 4 C y se revelaron y montaron 9 días después. No se detectaron marcas positivas en los controles negativos con sondas sentido.

ANÁLISIS

Los cortes se analizaron con un sistema de procesamiento automático de imagen (Dr. Don Clifton, University of Washington). Para los experimentos de marcación simple, el programa cuenta el número de agrupaciones de gránulos plateados (correspondiente a la marca positiva con ^{33}P) que representa a una célula, así como el número de gránulos por célula (índice semi cuantitativo del contenido de ARNm por célula) (Semaan *et al.* 2010; Kim *et al.* 2011; Kauffman *et al.* 2009). Las células fueron consideradas *Kiss1* o *Gnrh1* positivas si el número de gránulos excedía el fondo por 3 veces. Sondas sentido no revelaron marcación para los mensajeros analizados (control negativo).

Para las marcaciones dobles, las células *Kiss1* marcadas con DIG fueron identificadas en un microscopio de fluorescencia y la marca con ^{33}P positiva para *RGABA_{B1}* que se superponía en las células *Kiss1* fue medida por el sistema de procesamiento automático del Dr. Clifton. La relación señal/fondo para cada célula fue calculada y una célula *Kiss1* fue considerada marcada doblemente con *RGABA_{B1}* si la señal excedía 3 veces al fondo.

EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS

EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS EN NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS ESPECÍFICOS (QPCR)

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Ratones adultos (3-5 meses, hembras sacrificadas en estro) y de 4 días de edad (DPN4, día de nacimiento DPN1) de ambos sexos y genotipos (WT y *GABA_{B1}*KO) fueron sacrificados durante la mañana e inmediatamente se retiraron con cuidado los cerebros, se congelaron sobre hielo seco y se guardaron posteriormente a -80 C hasta la realización de los *micropunches* de núcleo específico.

En los cerebros congelados, tanto de ratones adultos como de ratones DPN4, se realizaron *micropunches* del núcleo anteroventro periventricular (AVPV/PeN) de 400µm de espesor y del núcleo arcuato (ARC) de 500µm de espesor (Kim *et al.* 2011). Brevemente, esto se realizó colocando los cerebros 45 minutos antes de comenzar en el crióstato para que alcancen la temperatura adecuada. Luego cada cerebro se colocó en un soporte para crióstato y se lo recubrió con Tissue Tek (Sakura Finetek, USA). Se comenzaron a realizar cortes del cerebro de 30µm hasta que se observa que las comisuras anteriores están muy cerca (Atlas de referencia: “The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Third Edition”. Franklin KBJ, Paxinos G). En ese momento se realiza un corte de 400µm para la obtención del AVPV/PeN, se coloca sobre un portaobjeto sobre hielo seco y se realiza el *punch* colocando el Harris Micro-Punch (Hole 2mm, TED PELLA, USA) en la base del hipotálamo alrededor del tercer ventrículo. Este *punch* se coloca en un tubo de 1,5ml y se mantiene sobre hielo seco. Nuevamente se realizan cortes de 30µm y luego de aproximadamente entre 35-40 cortes (Según figura 46-47 en “The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Third Edition”. Franklin KBJ, Paxinos G), se realiza un corte de 500µm para la obtención del ARC, se coloca sobre un portaobjeto sobre hielo seco y se realiza el *punch*, el cual se coloca en tubo de 1,5ml sobre hielo seco. Finalmente, las muestras se guardan a -80°C hasta la obtención del RNA.

De manera similar se realizaron *micropunches* de MeA, BNST y *septum* en cerebros congelados de ratones adultos únicamente.

EXTRACCIÓN DE ARN Y RETRO-TRANSCRIPCIÓN

El ARN total se extrajo utilizando el kit RNeasy Lipid Tissue Mini (QIAGEN, Valencia, CA). Brevemente, se le agrega 200µl del reactivo de lisis QUIAZOL al tubo con el tejido y se homogeniza la muestra. Luego se agrega 800µl del *buffer* de lisis QUIAZOL. Se realiza un vórtex y se deja 5 min a temperatura ambiente. Luego se le agrega 200µl de cloroformo y se realiza un vórtex. Se deja 3 min a temperatura ambiente y se centrifuga 15 min. a 12.000g 4°C. Posteriormente, se transfiere la fase acuosa a un tubo de 1.5ml. A éste se le agrega 1 volumen de ETOH 70% y se realiza un vórtex. Luego se transfiere 700µl a una columna con su tubo recolector. Se centrifuga la columna a temperatura ambiente 8.000g durante 30 seg., luego se descarta el líquido que se encuentra en el tubo colector y se coloca el resto de la muestra en la columna,

se centrifuga como en el paso anterior y se vuelve a descartar el líquido. Luego se le agrega a la columna 700µl de *buffer* RW1, se centrifuga a temperatura ambiente 8.000g durante 30 seg. y se descarta el líquido. Se agrega a la columna 500µl de *buffer* RPE, se centrifuga a temperatura ambiente 8.000g durante 2 min. Finalmente, se cambia el tubo recolector y se centrifuga a máxima velocidad durante 1 min. para eliminar todo el excedente de RPE. Posteriormente, se eluye el ARN con 25µl de H₂O libre de ARNasas centrifugando a 8.000g durante 1 min. Se le agrega nuevamente a la columna el eluido, más 10µl H₂O libre de ARNasas y se centrifuga nuevamente a 8.000g durante 1 min. Se guarda el ARN eluido (35µl) a -20°C hasta su retro-transcripción.

El ARN se cuantificó colocando 1.2µl de cada muestra en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) midiendo absorbancias a 260/280 y luego se retro-transcribió 500 ng por muestra en un volumen final de 20µl utilizando el kit Omniscript RT (QIAGEN) y el ADNc fue guardado a -20 C hasta su uso en la qPCR.

PCR EN TIEMPO REAL (QPCR)

La qPCR se realizó en el equipo Bio-Rad iCycler Detection System y se utilizó el kit SYBR Green PCR kit (QIAGEN) en un volumen final de 25 µl: 12,5 µl de enzima, 1 µl de cada primer (concentración final 0.4µM), 5 µl de una dilución 1/10 de ADNc y H₂O estéril para llevar a volumen. Por medio de esta técnica se estudió la expresión de *Kiss1*, *Pgr* (receptor de progesterona) y *Th* (tirosina hidroxilasa), utilizando *Gapdh* (gliceraldehido 3-fosfato) como gen control (Semaan *et al.* 2010). Los *primers* utilizados para cada gen blanco y para el gen control se encuentran detallados en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencias de *primers* utilizados para evaluar expresión de genes de interés en *micropunches* de núcleos específicos. *Gapdh* se utilizó como gen control.

Gen	Ensayo	Número acceso GenBank	Primer sentido 5'- 3'	Primer anti sentido 5'- 3'	Producto (bp)	Temp. Anneal. (°C)
<i>Kiss1</i>	qPCR	NM 178260.3	CAAAAGTGAAGCCTGGATCC	GTTGTAGGTGGACAGGTCC	254	60
<i>Pgr</i>	qPCR	NM 008829.2	CTCCTGGATGAGCCTGATG	CGCGGATATAGCTTGATCTC	293	60
<i>Th</i>	qPCR	NM 009377.1	GTACTTTGTGCGCTTCGAGG	CAGGTGGTGACACTTATCC	151	60
<i>Gapdh</i>	qPCR	NM 008084.2	TGCACCACCAACTGCTTAG	GGATGCAGGGATGATGTTC	177	60

Se realizaron curvas estándar para cada producto utilizando ADNc para *Kiss1*, *Th* y *Gapdh* para cuantificar la abundancia de ADNc en cada muestra. Para las curvas, se utilizaron diluciones seriadas de los clones de *Kiss1*, *Th* y *Gapdh* de 10 hasta 10⁸ copias.

Para *Pgr*, dado que no se tenía el producto clonado, se verificó la eficiencia de los *primers* con diluciones seriadas de un grupo de muestras y obtuvimos sólo la expresión relativa a *Gapdh*. Los parámetros del programa de qPCR fueron: 1 ciclo de 95 C durante 15 min, seguido de 50 ciclos de 94 C durante 15 s, 60 C durante 30 s y 72 C durante 30 s. La recolección de los datos se realizó a 72 C durante la fase de extensión. Para asegurarnos la presencia de un solo producto, se realizó una curva de disociación al finalizar la corrida. Los datos se recolectaron utilizando la función automática de umbral del programa Bio-Rad MyIQ. Todas las muestras se corrieron por duplicado y se normalizaron a *Gapdh*. El tamaño de los productos se confirmó en geles de agarosa 1/ teñidos con bromuro de etidio para la visualización de las bandas (Figura 3).

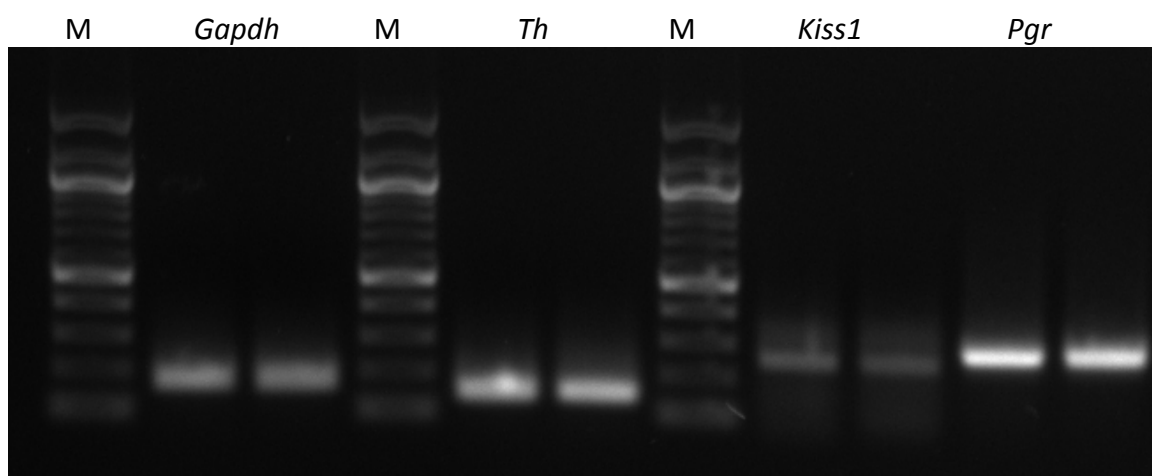


Figura 3: Gel de agarosa 1% en TAE 1X, utilizando Bromuro de Etidio para la visualización de las bandas: bandas correspondientes a productos de amplificación de qPCR de *micropunches* de núcleos específicos, con sus correspondientes tamaños: *Gapdh* (177pb); *Th* (151pb); *Kiss1* (254pb) y *Pgr* (293pb). M: marcador de peso molecular de 100pb.

EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS EN TEJIDOS (SQPCR Y QPCR)

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Ratones adultos (3-5 meses, hembras en estro) y de 4 días de edad (DPN4, día de nacimiento DPN1) de ambos sexos y genotipos (WT y GABA_{B1}KO) fueron sacrificados durante la mañana y se obtuvieron el hipotálamo anterior (HA) incluyendo el área preóptica (APO), hipotálamo medio basal y posterior (MBH), los bulbos olfatorios (BO), la adenohipófisis (HF), los ovarios (OV), los testículos y la corteza frontoparietal (CT, tejido control) para las distintas determinaciones de expresión génica. Los distintos tejidos se colocaron en tubos con 200ul de *RNA later* (Ambion) para preservar

el ARN y se guardaron durante toda la noche a 4C. Al día siguiente se les retiró el ARN later y se congelaron a -80C hasta la extracción de ARN total.

Los fragmentos hipotalámicos HA y HMB se obtuvieron con el siguiente criterio: el HA, conteniendo el área preóptica, es el triángulo limitado anteriormente por un plano que pasa por encima de la comisura anterior, lateralmente por las fisuras hipotalámicas, posteriormente por un plano que pasa inmediatamente detrás del quiasma óptico y en profundidad por el surco subtalámico; el HMB está limitado anteriormente por el plano que pasa inmediatamente detrás del quiasma óptico, lateralmente por las fisuras hipotalámicas, posteriormente por los cuerpos mamilares y en profundidad por el surco subtalámico. A continuación se muestra una foto representativa del cerebro conteniendo el HT, marcando las áreas evaluadas: HA y HMB (Figura 4).

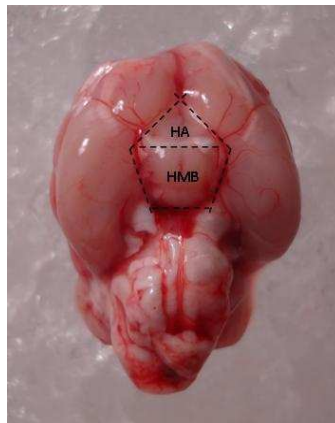


Figura 4: Vista ventral del cerebro en dónde se delimitan los fragmentos hipotalámicos obtenidos para las determinaciones: hipotálamo anterior (HA) y medio basal (HMB).

EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNC POR RETRO-TRANSCRIPCIÓN (RT)

Los tejidos obtenidos fueron homogeneizados en 300 μ l del reactivo TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc.) y guardados a -70 $^{\circ}$ C hasta su uso.

Los tejidos homogeneizados en TRI Reagent se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos y se continuó trabajando con los sobrenadantes. A éstos se les agregó cloroformo (60 μ l por cada 300 μ l de TRI Reagent utilizado) y se los mezcló por 30 segundos en agitador mecánico. Luego se centrifugaron nuevamente durante 10 minutos a 12,000 rpm y se transfirieron las fases acuosas a tubos de 0.6 ml con 2 μ l de glicógeno (Ambion). Allí se les agregó isopropanol (180 μ l por cada 300 μ l de TRI

Reagent utilizado), se agitó y se dejaron precipitando los ARNs a -20 °C ON. Al día siguiente se centrifugaron durante 30 minutos a 12,000 rpm y luego se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente, se lavaron los precipitados con 500 µl de ETOH 75 / (diluido en agua libre de ARNasas) y se centrifugaron 5 minutos a 12,000 rpm. Finalmente se descartaron los sobrenadantes y se dejaron secar los precipitados a temperatura ambiente durante unos minutos. Por último, se resuspendieron en 10 µl de agua libre de ARNasas y las concentraciones de ARN fueron determinadas por absorbancia a 260 nm en el fluorómetro Qubit™ fluometer (Invitrogen) utilizando el kit para medición de ARN Quant-iT™ RNA Assay Kit (Invitrogen). Los ARN totales se guardaron congelados a -70°C hasta su retro-transcripción.

Se obtuvo ADNc a partir de 1 µg de ARN total de cada muestra, excepto para testículo de 4 días de edad que se obtuvo ADNc a partir de 3 µg de ARN total. Según la concentración de cada muestra, se calculó el volumen necesario para esa masa de ADNc y se llevó a 10 µl con agua libre de ARNasas. La reacción de retrotranscripción (RT) se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl en presencia de 2 µl de *buffer* 10X (Epicentre), 2 µl de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 2 µl de DTT 1 mM (Epicentre), 1 µl de inhibidor de ARNasas RNaseOut Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/ul, Invitrogen), 0.8 µl de cebador oligo-(deoxythymidine)₁₅ (0.25 µg/µl; Biodynamics), 1 µl de transcriptasa reversa MMLV (10 U/ µl; Epicentre) y llevando a volumen final de 10 µl con agua libre de ARNasas. Finalmente se incubaron las muestras durante 60 minutos a 37 °C. Para verificar que no existiera contaminación con ADN genómico, se omitió la transcriptasa reversa en los controles y se completó el volumen con agua libre de ARNasas. La ausencia de fragmentos de ADN amplificados por PCR en estos controles indicó el aislamiento de ARN libre de ADN genómico.

PCR SEMICUANTITATIVA (SQPCR)

El HA y HMB de ratones de 4 días de edad fueron obtenidos como lo describimos anteriormente, al igual que la obtención del ARNm y la RT. La sqPCR se realizó según el protocolo previamente descrito por González y col. (Gonzalez *et al.* 2011). Brevemente, se agregaron 4 ul del producto de la RT (1ug/20ul) a una mezcla de reacción conteniendo: buffer de reacción (green GoTaq reaction buffer Promega 2X, volumen óptimo para un ensayo de 50 ul), *primer* sentido 1 uM y *primer* antisentido 1 uM específicos para el gen blanco (*Kiss1*) o el gen de expresión constitutiva (*Gapdh*),

dNTPs 0,2 mM y 1 UI de ADN polimerasa (GoTaq, Promega). Como control negativo se utilizó un tubo de reacción sin templado. A continuación se detallan los *primers* utilizados para la PCR semicuantitativa (sqPCR) en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias de *primers* utilizados para evaluar expresión de genes de interés en hipotálamo anterior y medio basal mediante PCR semicuantitativa (sqPCR). *Gapdh* se utilizó como gen control.

Gen	Ensayo	Número acceso GenBank	Primer sentido 5'- 3'	Primer anti sentido 5'- 3'	Producto (bp)	Temp. Anneal. (°C)
<i>Kiss1</i>	sqPCR	NM 178260.3	AGCTGCTGCTTCTCCTCTGT	AGGCTTGCTCTCTGCATACC	140	60
<i>Gapdh</i>	sqPCR	NM 008084.2	CCAGAACATCATCCCTGCAT	GTTCAGCTCTGGGATGACCTT	67	60

La reacción de PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad con los siguientes tiempos y temperaturas de reacción: 4 min a 94 °C; 35 ciclos: 30 seg a 94 °C, 1 min a 60 °C y 1 min 30 seg a 72 °C, seguidos por un ciclo de 6 min a 72 °C. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2% en buffer TBE conteniendo bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz UV y se compararon con un marcador de fragmentos de ADN de número de pares de bases conocido. Los geles con las bandas obtenidas se fotografiaron y la intensidad de cada banda se cuantificó con el software ScionImage (Scion Corporation, National Institutes of Health, USA). Los resultados se presentaron como el valor de intensidad promedio relativo a *Gapdh* ± error estándar medio (ESM) para cada grupo.

PCR EN TIEMPO REAL (QPCR)

Las secuencias sentido y anti sentido de los *primers* fueron diseñadas basadas en las secuencias de ADNc publicadas usando el programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA) o el programa Primer Blast, que se encuentra gratuito en Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), excepto para *Gad1* que se encontraba previamente publicado (Pleau *et al.* 2001). Los oligonucléidos se enviaron a sintetizar a Invitrogen. Las secuencias de los *primers* utilizados para qPCR de *Gnrh1*, *Gad1*, *Kiss1r*, *Cyp19a1*, *Gnrh1r*, *Lhb*, *Esr1* y *Ciclofilina b* (gen control) se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3: Secuencias de *primers* utilizados para evaluar expresión de genes de interés en tejidos mediante PCR en tiempo real (qPCR). *Ciclofilina b* se utilizó como gen control.

Gen	Ensayo	Número acceso GenBank	Primer sentido 5'- 3'	Primer anti sentido 5'- 3'	Producto (bp)	Temp. Anneal. (°C)
<i>Gnrh1</i>	qPCR	NM 008145.2	GAACCCAGCACTTCGAATGT	TGGCTTCCTTCAATCAGACTTT	94	58
<i>Gnrh1r</i>	qPCR	NM 010323.1	GCCCACAGTCTTCTCGCAATG	ATGAGGAGGGGGATGATGA	111	55
<i>Gad1</i>	qPCR	NM 008077.4	GCGGGAGCGGATCCTAATA	TGGTGCATCCATGGGCTAC	79	58
<i>Kiss1r</i>	qPCR	NM 053244.5	TGCAA ATTCGTCAAC TACATC	GGAACACAGTCACATACCAG	97	55
<i>Lhb</i>	qPCR	NM 008497.2	TGTCAACGCAACTCTGGCC	GGCAGTACTCGGACCATGCT	105	55
<i>Esr1</i>	qPCR	NM 007956.4	ATGAAAGGCGGCATACGGAAAG	CACCCATTTCATTTTCGGCCTTC	94	60
<i>Cyp19a1</i>	qPCR	NM 007810.3	CGGGCTACGTGGATGTGTT	GAGCTTGCCAGGCGTTAAAG	135	55
<i>Ciclofilina b</i>	qPCR	NM 011149.2	GACCTCCGTGGCCAACGAT	ACGACTCGTCTACAGATTCATCTC	97	60

La qPCR se realizó utilizando el Kit SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo estándar establecido. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 13 μ l: 6.5 μ l del kit y la concentración adecuada de primers (concentración final 0.15-0.3 μ M) y cantidad de muestra necesaria (1-3 μ l) tanto para las muestras como para la curva estándar, y completando al volumen final con agua estéril. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: 95 °C durante 10 minutos (activación de la enzima; 1 ciclo); 95 °C 15 segundos (desnaturalización) – temperatura y tiempo de apareamiento (15 seg.- 1 min.) según gen analizado (apareamiento)- 60 °C 1 minuto (extensión y lectura de fluorescencia) repetido 45 ciclos.

Cada muestra fue analizada por duplicado junto con controles sin molde para monitorear contaminación con ADN genómico.

Los productos acumulados de ADN fueron monitoreados por el sistema de detección del equipo ABI7500 (Applied Biosystems), y los resultados fueron registrados y guardados continuamente y en tiempo real durante la reacción. La señal de fluorescencia es normalizada por cambios en la concentración o volumen dividiendo la intensidad de emisión del SYBR GREEN por la intensidad de emisión de la referencia interna (ROX). Esta relación es definida como Rn. El programa grafica en la curva de amplificación el Rn y el Δ Rn (que representa el Rn menos la señal de base establecida automáticamente entre los ciclos 3 y 15 de la reacción) en función de los ciclos.

Para evaluar la especificidad de la reacción de PCR se realizaron protocolos de disociación de los productos de PCR, generadas al final de la corrida mediante el aumento de la temperatura de las muestras desde 60 °C hasta 95 °C, mientras se

registraba la fluorescencia de los productos, la cual disminuye a velocidad constante a medida que se desnaturalizan las cadenas de ADN. A una dada temperatura la velocidad de caída de la fluorescencia aumenta drásticamente y a esta temperatura se la llama temperatura de disociación o T_m . El programa grafica simultáneamente la curva de disociación, es decir la segunda derivada de la función de fluorescencia en función de la temperatura. A continuación se muestra un ejemplo representativo de las curvas de amplificación y de disociación para *Ciclofilina b* utilizada como gen control (Figura 5).

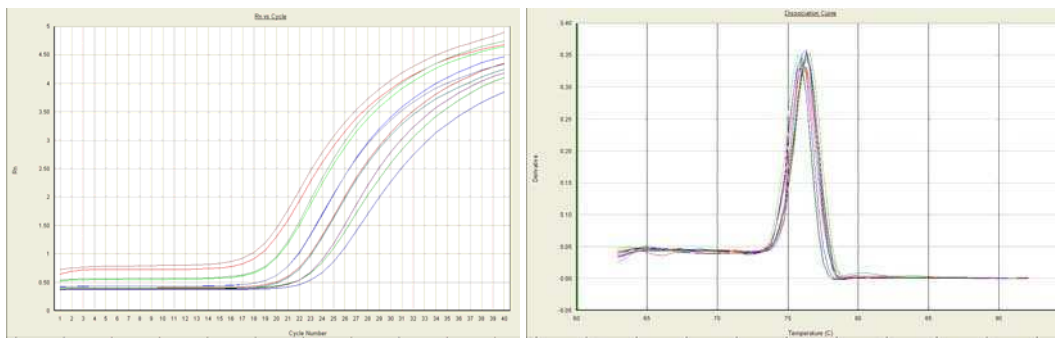


Figura 5: Curvas de amplificación (izquierda) y de disociación (derecha) obtenidas durante la corrida de qPCR para el gen control *Ciclofilina b*.

La pureza de los productos fue confirmada posteriormente tanto con la disociación de los productos de PCR (presencia de un único pico a la T_m esperada para el gen en cuestión), como por electroforesis en geles de agarosa 2.5 / para verificar el tamaño del producto esperado y la ausencia de bandas inespecíficas (Figura 6).

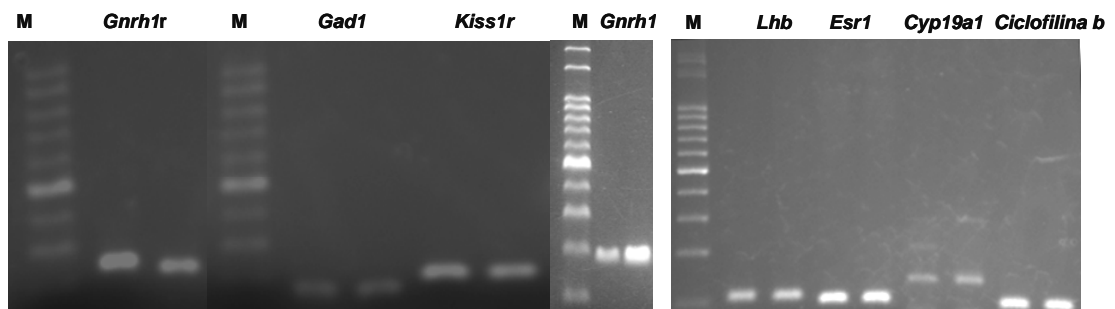


Figura 6: Gel de agarosa 2.5 / en TBE 0,5 / , utilizando SYBR Green para la visualización de las bandas: bandas correspondientes a productos de amplificación mediante qPCR de genes de interés, con sus correspondientes tamaños: *Gnrh1r* 111pb, *Gad1* 78pb, *Kiss1r* 97pb, *Gnrh1* 94pb, *Lhb* 105pb, *Esr1* 94pb, *Cyp19a1* 135pb, *Ciclofilina b* 97pb. M: marcador de peso molecular de 50pb (izquierda) o 100pb (derecha).

ANÁLISIS

Los cálculos de la concentración inicial de ARNm en cada muestra se realizaron de acuerdo al método del ciclo en el que se alcanza el umbral de detección, donde todas las muestras pueden ser comparadas entre sí. Este umbral de detección se establece en base a la fluorescencia del *background* y equivale a 10 veces la desviación estándar de la media de emisión de la línea de base. Al ciclo en el cual cada muestra consigue llegar a este umbral de detección, se lo conoce como Ct y es inversamente proporcional a la cantidad de templado inicial. El Ct de cada muestra fue calculado utilizando el programa ABI7500 sequence detection system, con una línea de base automática.

Para cada gen analizado la expresión relativa fue normalizada a la de *ciclofilina* (gen control de expresión constitutiva) y el cálculo de la expresión relativa se obtuvo aplicando el modelo matemático de Pfaffl (Pfaffl 2001) que se detalla a continuación:

$$\text{Expresión relativa} = (E \text{ gen blanco})^{\Delta Ct (\text{gen blanco})} / (E \text{ ciclofilina})^{\Delta Ct (\text{ciclofilina})}$$

E = eficiencia del set de primers (calculada a partir del rango dinámico de diluciones seriadas)

$$\Delta Ct = Ct (\text{muestra referencia de valor 1}) - Ct (\text{muestra a analizar}).$$

La eficiencia de amplificación (E) de cada set de *primers* (para cada tejido evaluado) fue calculada a partir de rango de diluciones seriadas de un ADNc de referencia (*pools* para cada tejido) que cubría la cantidad de ARNm esperada en las muestras experimentales (rango dinámico). Se graficó el log de la cantidad de ADNc en función del promedio de Ct de cada punto de la curva y se obtuvo una clara correlación lineal entre la cantidad de ADNc y el Ct en al menos 40 ciclos de PCR en tiempo real. Con la pendiente de esta curva de calibración, se calculó la E de las reacciones mediante la siguiente fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

Se utilizaron únicamente los set de primers que proporcionaban una $E = 2 \pm 0.2$. A continuación se muestra un gráfico representativo del Log ($\mu\text{g ADNc}$) vs promedio Ct para *Ciclofilina b* con su correspondiente eficiencia (Figura 7). Los resultados se expresan relativos al gen control (*Ciclofilina b*). La muestra referencia, a la cual se le adjudica el valor 1, en nuestro caso fue un macho WT elegido al azar.

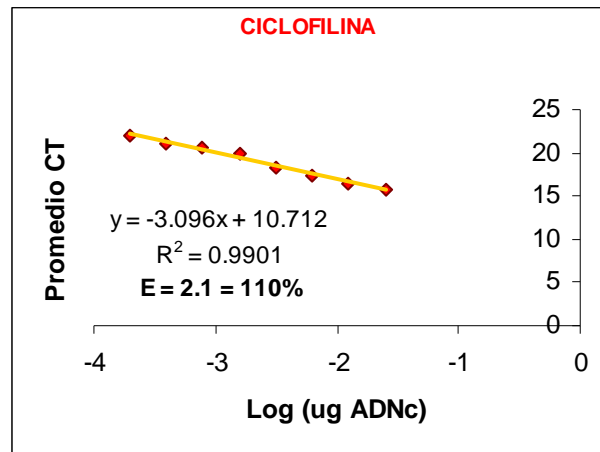


Figura 7: Promedio de Ct en función del Log (ug ADNc) para una curva de diluciones seriadas del gen control *Ciclofilina b*. A partir de la pendiente del ajuste lineal se obtiene la eficiencia para dicho par de primers.

LOCALIZACIÓN DE NEURONAS GNRH POR INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

OBTENCIÓN, PREPARACIÓN E INCLUSIÓN DE LAS MUESTRAS

La inmunohistoquímica (IHQ) de las neuronas de GnRH se realizó según metodología habitual descrita por Miranda y col. (Miranda *et al.* 2003). Se estudió la inmunoreactividad a GnRH en ratones de ambos sexos y genotipos a DPN4, tomando el día de nacimiento como DPN1.

Brevemente, se sacrificaron por decapitación a las crías a DPN4, se tomaron las cabezas, se les quitó la piel y la calota para exponer el cerebro, y luego se colocaron con la mandíbula intacta en frascos, inmersas en Líquido de Bouin (Fijador saturado de Ácido Pírico: 75 ml, Formaldehído: 20 ml, filtrado y se agrega antes de usar ácido acético glacial: 5 ml) en un volumen 10 veces mayor al volumen de la muestra, durante 2 hs a 4°C.

Transcurrido ese tiempo, se extrajo el cerebro del cráneo y se le renovó el líquido fijador. Luego, se colocó nuevamente durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se colocó el cerebro en ETOH 70° a 4 °C, realizando cambios cada media hora, por lo menos 5 veces.

Posteriormente se comenzó con la deshidratación en alcoholes de graduación creciente: a cada cerebro se le realizó un pasaje en ETOH 70°, un pasaje en ETOH 90°, un pasaje en ETOH 96° y dos pasajes en ETOH 100°, durante 30 minutos cada uno.

Luego, bajo campana química, se colocó cada cerebro en una solución 50:50 de ETOH 100%/xilol durante 20 minutos y luego en xilol puro durante 30 minutos. Finalmente se colocó cada cerebro en estufa a 60 °C en una solución 50:50 de xilol-parafina Paraplast (Leica Microsystems) durante 20 minutos, antes de comenzar con los pasos de inclusión. Para la inclusión se realizaron 1 pasaje en parafina durante 30 min. y dos pasajes más en parafina de 20 min cada uno.

Finalizados estos pasajes de inclusión se realizó el armado de los tacos y se guardaron a 4 °C hasta el momento de la realización de los cortes.

OBTENCIÓN DE CORTES Y PROTOCOLO DE IHQ PARA GNRH

Se realizaron cortes coronales de 6 µm aproximadamente en un micrótomo Leica RM 2125RT. Las secciones se adhirieron sobre portaobjetos cargados positivamente. Se secaron luego en placa térmica a 30 °C por una hora para ser guardados a 4 °C hasta el momento de ser utilizados. En este caso, machos y hembras de ambos genotipos se procesaron en ensayos diferentes.

La desparafinación de los cortes se realizó con xilol (2 cambios de 15 min cada uno), luego se hidrataron con alcoholes de graduación decreciente (2 cambios de 10 min cada uno) y se realizaron lavados con PBS 1X (2 cambios de 10 min cada uno). Luego se realizó el bloqueo de peroxidasas endógenas con una solución al 0.3% de agua oxigenada durante 35 min a temperatura ambiente. Luego se hicieron tres lavados con PBS 1X de 5 min cada uno. Posteriormente, se realizó un bloqueo de inespecífico con Blotto (leche descremada 5% ; Triton X-100, 0.3% ; PBS 1X) durante 30 min. Sin lavar, se incubaron los cortes toda la noche a 22 °C con el anticuerpo primario (LRH13 1:1000, generosamente donado por el Hormone Assay Centre, Institute of Endocrinology, University of Gumma, Japan (Park & Wakabayashi 1986)). Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS 1X (2 cambios de 10 min cada uno). Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado (*Linker reagent*, LSAB2 System-HRP, Dako) cubriendo los cortes durante 30 minutos a 22°C. Se realizaron los lavados con PBS 1X (2 cambios de 10 min cada uno). Luego se incubaron los cortes con la Streptavidina unida a peroxidasa (*Tracer reagent*, LSAB2 System-HRP, Dako) cubriendo los cortes durante 35 minutos a 22 °C. Se realizaron lavados con PBS 1X (2 cambios en oscuridad de 10 min cada uno) y finalmente se reveló con diaminobenzidina (*Kit Stable*

DAB/Plus: 1 ml de Stable DAB/20 µl del cromógeno) durante 3 minutos y se paró la reacción con PBS 1X.

Por último se montaron los cortes con previa deshidratación en alcoholes de graduación creciente (10 minutos cada pasaje, con 2 cambios en ETOH 100° y dos de xilol). Finalmente se montaron con Bálsamo de Canadá sintético (Biopack).

ANÁLISIS

Los cortes fueron analizados con un microscopio Nikon Eclipse E600 y fotografiados. Se analizó un corte cada 40 µm para contar una única vez cada neurona. Se consideraron solamente las neuronas que presentaron un núcleo claro y el cual haya sido cortado a la mitad. Se contaron el número de neuronas inmunoreactivas para GnRH (ir-GnRH) en los BO, el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT) y el APO aproximando las coordenadas a partir del atlas para ratones de DPN6 (Paxinos *et al.* 2007): OB: desde P6 #1 0.99 mm hasta P6 #6 2.07 mm; OVLT: desde P6 #17 3.39 mm hasta P6#18 3.51 mm y APO: desde P6 #22 3.99 mm hasta P6 #24 4.23 mm.

EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN PULSÁTIL DE GNRH

Los estudios de pulsatilidad se realizaron *in vitro* como se describió previamente (Heger *et al.* 2003; Catalano *et al.* 2010).

Brevemente, para el primer ensayo de pulsatilidad de GnRH, se sacrificaron ratones adultos WT y GABA_{B1}KO (hembras en estro) y se recolectó inmediatamente el HT, se pesó y se incubó en microtubos de 1.5 ml que contenían 250 µl de *buffer* bicarbonato Krebs-Ringer pH 7,4 (NaCl 115 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,56 mM, NaHCO₃ 20mM) con 4,5 mg/ml glucosa y 16 mM HEPES preparado en el momento, a 37 °C. Luego de 30 minutos de preincubación, el medio de cada tubo se recolectó a intervalos de 8.5 minutos durante 6 horas en *buffer* fosfosalino con bacitracina (Sigma) 2,5 mM (para evitar la degradación del GnRH) y se reemplazó por medio fresco. GnRH se midió en el medio mediante la técnica de RIA en alícuotas de 150 µl.

El segundo ensayo de pulsatilidad de GnRH incubando hipotálamos en presencia de agonistas y antagonistas del *Kiss1r* se realizó con hembras ovariectomizadas en la adultez, con reemplazo hormonal de una única dosis de 10µg/kg de valerato de

estradiol el día de la castración. Al cabo de 7 días post-ovariectomía, se sacrificaron las ratonas y se siguió el protocolo descrito arriba, recolectando el medio cada 9 minutos, durante 7:30 hs. Se estudiaron 4 tratamientos para cada genotipo: control (Krebs-Ringer), Kiss-10 (agonista, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., 1.10^{-7} M (Castellano *et al.* 2005; Constantin *et al.* 2009)), Kiss-234 (antagonista, Sigma, 1.10^{-7} M (Roseweir *et al.* 2009)) y la combinación de éstos (Kiss-10+Kiss-234, 1.10^{-7} M de cada uno). GnRH se midió en el medio mediante la técnica de RIA en alícuotas de 220 μ l.

En ambos casos, los pulsos de secreción de GnRH fueron identificados y sus parámetros fueron determinados por el algoritmo Cluster8 desarrollado por Veldhuis and Johnson (1986) (Veldhuis & Johnson 1986). Se utilizó una configuración de cluster 2 x 2 y un estadístico de 2 para los picos ascendentes y descendentes, para mantener la tasa de error por falsos positivos y falsos negativos por debajo del 10% como fuera sugerido por Martínez de la Escalera y col. (Martinez de la Escalera *et al.* 1992).

MEDICIÓN DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Se determinaron los niveles de GABA, glutamato y taurina en HT y CT de ratones adultos y de 4 días de edad, WT y GABA_{B1}KO de ambos sexos.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Estos aminoácidos se midieron usando el procedimiento descrito previamente por Saller y col. (Saller & Czupryna 1989) con mínimas modificaciones. Para ello se utilizaron los sobrenadantes obtenidos de la homogeneización de los tejidos en 100 μ l de HCl 0,1 N a 4 °C y posterior centrifugación durante 30 minutos a 13,000 x g. Alícuotas de los sobrenadantes y patrones de cada uno de los aminoácidos preparados en HCl 0,1 N, se evaporaron a sequedad en un concentrador Speed-Vac® Savant (Savant Instruments, Hicksville, NY, EEUU). A los extractos secos se les agregó 100 μ l de HCO₃Na 0,1 M y 200 μ l de cloruro de dansilo (Sigma-Aldrich) (1,25 mg/mL en acetona anhidra) y se resuspendieron utilizando un agitador mecánico. Posteriormente se incubaron durante 60 minutos a 60 °C en oscuridad. Se obtuvieron derivados dansilados de los patrones y de las muestras. Estos fueron evaporados a sequedad en un concentrador Speed-Vac® Savant y los residuos secos fueron almacenados a -20 °C hasta el momento de la determinación.

PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN POR HPLC

En el momento de la determinación los residuos secos fueron vigorosamente resuspendidos en 200 µl de la fase móvil utilizando un agitador mecánico y colocándolos en un baño ultrasónico. Finalmente se centrifugaron los tubos a 13,000 x g durante 3 minutos para remover la materia particulada antes de inyectar alícuotas de 20 µl de los sobrenadantes en el sistema de HPLC. El sistema HPLC utilizado consistió en un módulo programable de solventes (bombas y mezclador) Modelo 125 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EEUU), una columna de fase reversa de 5-µm de tamaño de partícula, 25 cm X 4,6 mm Ultrasphere[®] ODS (Beckman), un detector UV programable Modelo 166 (254 nm) (Beckman) y el programa System Gold[®] para el análisis de los cromatogramas (Beckman). La fase móvil consistió de una mezcla de agua-acetonitrilo (82:18, v/v) conteniendo 0.15% (v/v) ácido fosfórico.

MEDICIÓN HORMONAL POR RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

SUERO

Al sacrificar ratones adultos, de 14 y 4 días de edad, WT y GABA_{B1}KO por decapitación, se recolectó la sangre troncal, se colocó en tubos de 1.5 ml y se dejó coagular a temperatura ambiente durante aprox. 4 horas. Luego se centrifugaron los tubos a 2000 rpm durante 10 minutos y se transvasó el suero (fase superior) a un tubo de 0.6 ml. Posteriormente, se volvieron a centrifugar los tubos originales a 2000 rpm durante 10 minutos para recolectar el suero remanente y se agregó a la primera fracción. Los sueros así obtenidos, se guardaron a -20 °C hasta la medición de las hormonas por RIA.

TEJIDOS

Se recolectaron el hipotálamo (HT), los bulbos olfatorios (BO), corteza frontoparietal (CT, tejido control), la adenohipófisis (HF) y las gónadas de ratones adultos y de 4 días de edad WT y GABA_{B1}KO, se pesaron y se guardaron a -20 °C hasta su homogeneización. Para los ratones de 14 días de edad únicamente se recolectaron HF y gónadas.

Para medir el contenido de GnRH, se homogeneizaron los fragmento hipotalámicos HA y HMB, los BO y la CT de ratones de 4 días de edad en 100 µl de HCl 0.1 N a 4 °C,

mediante un micro-homogeneizador como fue descrito previamente por Heger y col. (Heger *et al.* 2003). El homogenato se centrifugó por 30 minutos a 13,000 x g a 4 °C y se recuperó el sobrenadante; este procedimiento se repitió para extraer GnRH remanente en el precipitado. Las muestras se guardaron a -20 °C hasta que se llevaron a cabo los ensayos de RIA para GnRH.

Para la medición del contenido adenohipofisario de hormonas proteicas (LH, FSH y PRL), cada HF fue homogeneizada en 100 µl de *buffer* fosfosalino compuesto por *buffer* fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M y azida sódica 0.01/ pH 7,4, con inhibidores de proteasas [fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich) 1/100 y otra mezcla preformada de los inhibidores TPCK, TAME, ZPCK y TLCK (Sigma-Aldrich), 1/100], en hielo mediante un micro-homogeneizador manual. El contenido de proteínas en cada muestra fue determinado por el método de Lowry (Lowry *et al.* 1951) y los resultados determinaron la alícuota de homogenato que luego fue medida por RIA.

Para la medición del contenido gonadal de testosterona (T) y estradiol (E₂), los tejidos se homogeneizaron en 20 mL/g testículo o 450 µl /ovario de *buffer* Tris-HCl 10 mM pH 7,5 con inhibidor de proteasas [fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich) 1/100 y otra mezcla preformada de los inhibidores TPCK, TAME, ZPCK y TLCK (Sigma-Aldrich), 1/100] mediante un homogeneizador electromecánico (Polytron[®], Kinematica AG, Suiza). Los homogenatos se centrifugaron a 750 x g durante 10 minutos a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. De allí se tomaron alícuotas de 20 µl para la determinación de proteínas y el restante se almacenó a -20 °C hasta la determinación de hormonas esteroideas mediante RIA. El contenido de proteínas en cada muestra fue determinado por el método de Lowry (Lowry *et al.* 1951).

Se extrajeron una alícuota de 700 µl del sobrenadante de la homogeneización de los testículos y todo el sobrenadante de la homogeneización de los ovarios para la realización de los RIA de T y E₂, dos veces con 3 mL de éter etílico por vez. Los extractos se evaporaron en un baño a 50 °C en campana química y se disolvieron, posteriormente, en *buffer* fosfato 0,075 M, azida sódica 0,02/ , NaCl 154 mM, pH 7,0, conteniendo 0,1/ (P/V) de gelatina (*buffer* fosfosalino gelatina): 1 ml (testículos) o 1,2 ml (ovarios).

Para la medición de progesterona (P₄) sérica se extrajeron 75 µl de suero dos veces con 1 ml de éter etílico, se procedió de manera similar a lo mencionado para testículo

y ovario y se resuspendieron los extractos evaporados en 1.2 ml de *buffer* fosfosalino gelatina.

Las muestras permanecieron luego 24 horas a 4 °C para la disolución de las hormonas esteroideas en el *buffer* fosfosalino gelatina.

RIA PARA HORMONAS PROTEICAS

El contenido adenohipofisario y los niveles séricos de LH, FSH y los niveles séricos de PRL fueron determinados por RIA por doble anticuerpo (Libertun 1980). Las muestras fueron evaluadas por duplicado en alícuotas de 75 µl de suero de ratón para LH; 50 µl (adultos y 4 días) o 25 µl (14 días) para FSH y 30 µl para PRL. Para los homogenatos de HF se utilizaron alícuotas de 10 µl para LH y FSH. En animales de 4 días de edad, los niveles séricos de LH, FSH y se determinaron en *pools* de suero provenientes de 2 a 4 animales, de forma tal de obtener el volumen necesario para la determinación.

A continuación se detalla el protocolo para LH, siendo éste esencialmente el mismo para FSH y PRL.

HORMONA LUTEINIZANTE (LH)

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

Se utilizó 2.5 µg de LH purificada, r-LH-I10 (NIDDK). La hormona liofilizada se disolvió en una solución de *buffer* fosfosalino compuesto por *buffer* fosfato 0.01 M, NaCl 0.15 M y azida sódica 0.01/ pH final 7.4 (PBS) 0.01 M a una concentración final de 100 µg/ml. La marcación se efectuó en tubos de vidrio, bajo campana. Se usó ¹²⁵I (NEN), libre de portador y apto para marcar proteínas. Las soluciones que se emplearon fueron: *buffer* fosfato 0,5 M pH 7,5; *buffer* fosfato 0,05 M pH 7,5; PBS; solución de transferencia: 100 mg de IK, 0,8 g de sacarosa y cantidad suficiente de H₂O para alcanzar un volumen final de 10 ml; 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.

Se procedió a la separación la hormona marcada del ¹²⁵I libre mediante una columna de tamiz molecular de Bio-gel P-10 gel (Bio- rad Laboratories, CA, EEUU), en *buffer*

fosfato 0,05 M. Los sitios activos de dicha columna fueron saturados previamente mediante el pasaje de 1ml de PBS con EDTA 0,05 M y 2/ de BSA.

Procedimiento de marcación

A la hormona disuelta en PBS se le añadieron 10 μ l de *buffer* fosfato 0.5 M y luego 0.5 mCi de 125 I. La oxidación se efectuó con 11.25 μ l de la solución de cloramina-T, bajo agitación suave durante 60 segundos. La reacción se detuvo con 6.25 μ l de metabisulfito de sodio. Luego se agregaron 100 μ l de la solución de transferencia (que verifica si hubo un exceso de agente oxidante), y el contenido del tubo de marcación fue pasado por la columna de separación. Para la corrida se utilizó *buffer* fosfato 0.05 M. Se recogieron aproximadamente 500 μ l de eluido por tubo, y se registró la radioactividad de 10 μ l de cada uno de los tubos en un contador gamma Packard para determinar dónde se encontraba el pico de hormona marcada. 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 tubos de marcación conteniendo la hormona marcada se reunieron en uno y se congelaron en alícuotas para su posterior uso en RIA.

Protocolo de RIA

El primer antisuero contra LH de rata fue NIDDK-Anti-Rat-LH-S-11 obtenido al inmunizar conejos con LH de rata altamente purificada semejante a la NIDDK-rLH-I-10. El anticuerpo se diluyó en PBS, EDTA 0.05 M con 0.25/ de suero de conejo normal, pH 7.4, a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo. La dilución inicial fue de 1:274400. 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 (suero u homogenato de adenohipófisis) fueron realizadas en PBS con 1/ de albúmina de huevo (*buffer* EA). La separación se logró por segundo anticuerpo, usando antisuero de oveja contra globulina de conejo diluido en PBS-polietilenglicol 6000 8/ , en diluciones de trabajo establecidas previamente (dilución inicial 1:500).

Los resultados fueron expresados en términos de los estándares de LH de rata RP3, ya que está demostrada la reactividad cruzada con LH de ratón. La sensibilidad del ensayo fue de 0.21 ng/ml (suero) o 0.16 ng (homogenato de adenohipófisis) 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 100 µl del primer anticuerpo (diluído en PBS-EDTA) y 100 µl de la hormona trazadora (entre 17.000 y 20000 cpm por tubo) a la curva patrón y a las alícuotas experimentales preparadas en *buffer* EA (400 µl final); luego de una incubación de 24 horas a temperatura ambiente se agregaron 500 µl del segundo anticuerpo en polietilenglicol 6000 8/ . Se incubaron los tubos durante 2 horas a temperatura ambiente y durante 1 hora a 4°C. Se separó la hormona libre de la unida, por centrifugación refrigerada (4°C, Beckmman Instruments) a 2000 rpm, durante 30 minutos. El sobrenadante fue aspirado y se leyó la radiactividad asociada al precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo en un contador gamma Packard (Palo Alto, CA, EEUU).

Los RIA para FSH y PRL fueron elaborados de manera muy similar, por lo que se describirá en los próximos, sólo aquellos puntos que difieran.

HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

La hormona FSH trazadora fue NIDDK-rat-FSH-I-9. El método de marcación fue semejante al descripto 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 1:42000. 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 0.12 a 15 ng por tubo. Los resultados fueron expresados en términos de los estándares de FSH de rata RP2, dado que FSH de rata también cruza con ratón. La sensibilidad del ensayo fue 4.8 ng/ml (suero) y de 1.2 ng (homogenatos de adenohipófisis). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayos para fueron de 8.0/ y 13.2/ respectivamente.

RIA PARA PROLACTINA (PRL)

El ensayo para PRL de rata no presenta reactividad cruzada con la PRL de ratón, por lo que se implementó el RIA de PRL de ratón. La hormona trazadora fue AFP10777D. El primer antisuero fue IgG policlonal de conejo anti-PRL de ratón AFP131078, dilución inicial 1:140000. El estándar de referencia fue PRL purificado de ratón (mPRL-AFP-6476C). La curva patrón se extiende de 0,02 a 5 ng por tubo. La sensibilidad del ensayo fue de 0,67 ng/ml, y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7,8% y 12,14%, respectivamente.

RIA PARA LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GNRH)

Se determinó el contenido de GnRH en los fragmentos hipotalámicos HA y HMB, BO y CT en ratones de 4 días de edad, WT y GABA_{B1}KO. Además se determinó el GnRH liberado a partir de incubaciones hipotalámicas para evaluar su liberación pulsátil en ratones adultos de ambos sexos y genotipos.

Procedimiento de marcación

El estándar de GnRH (Bachem, CA, EEUU) fue marcado con ¹²⁵I (Na¹²⁵I, NEZ033H New England Nuclear, EEUU) de acuerdo con el método descrito por Yu y colaboradores (Yu *et al.* 1988). Brevemente, 1 mCi de Na¹²⁵I en 10 µl de PBS 0,5 M pH 7,5 y 5 µl de cloramina-T en 10 µl de PBS 0,05 M fueron agregados a 10 µg del péptido estándar disuelto en 10 µl de ácido acético 0,1 M. Esta solución se mantuvo durante 60 segundos bajo agitación suave a temperatura ambiente. Transcurrido dicho período la reacción se frenó por dilución mediante el agregado de 200 µl de acetato de amonio 2 mM pH 4,5. Para separar el péptido marcado del yodo libre, se emplearon columnas (de intercambio iónico) de carboximetilcelulosa, preparadas y equilibradas en el laboratorio. El producto de la reacción se sembró inmediatamente en esta columna y se eluyó inicialmente con 15 ml de acetato de amonio 2 mM. Se tomaron 5 fracciones del eluido conteniendo cada una 3 ml, en las que eluye el ¹²⁵I libre. Luego se incrementó la fuerza iónica eluyendo con acetato de amonio 100 mM pH 4,5 y recuperando fracciones de 1,5 ml. Las fracciones con marca que eluyen luego del pico del yodo libre son ensayadas para evaluar la unión específica en un RIA.

Protocolo de RIA

El ensayo se realizó en 500 μ l de volumen final, se tomaron 100 μ l de muestra por duplicado proveniente de los homogenatos de HA y HMB de ratones de 4 días de edad, 150 μ l de muestra proveniente de los medios de incubación de explantos de hipotálamos o 220 μ l de explantos HT de hembras castradas, 100 μ l de anticuerpo [HU-60 desarrollado contra GnRH, obtenido por una generosa donación del Dr. H. Urbanski (Urbanski *et al.* 1990; Urbanski *et al.* 1990), empleado en una dilución inicial de 1:20000] y 100 μ l de la hormona marcada (aproximadamente 10.000 cpm), llevando a volumen final con *buffer* fosfato 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, azida sódica 15 mM, BSA 0,5 / , pH 7,6. Luego de incubar 24 horas a 4 °C se precipitaron las inmunoglobulinas mediante el agregado de 1,5 ml de etanol 100 / , se mezcló vigorosamente con agitador mecánico, se incubó durante 30 minutos a 4 °C y luego se centrifugó por 30 minutos a 3000 rpm y 4 °C, separando de este modo el complejo hormona-anticuerpo (precipitado) de la hormona libre (sobrenadante). El sobrenadante fue descartado y se registró la radiactividad asociada al precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo.

La sensibilidad del ensayo fue 2,5 pg/150 μ l de medio, que corresponde a 0,15 pg/mg de hipotálamo (pulsatilidad de GnRH) y de 2,1 pg (contenido de GnRH); los coeficientes de variación intra e inter-ensayos fueron de 4,5/ y 5,3/ respectivamente. La curva estándar se extendió de 0,977 a 1000 pg por tubo.

RIA PARA HORMONAS ESTEROIDEAS

Los niveles séricos de E₂ en hembras y T en machos adultos WT y GABA_{B1}KO fueron determinados en el servicio a terceros de la Universidad de Virginia, USA. E₂ sérico fue determinado mediante el único Kit de ELISA avalado hasta el momento para la determinación de niveles séricos de E₂ en ratón (Haisenleder *et al.* 2011).

Los contenidos gonadales de E₂ y T en ratones adultos, de 14 y 4 días de edad y los niveles séricos de P₄ en ratones adultos, se determinaron en nuestro laboratorio mediante RIA con métodos de rutina que se describen a continuación.

RIA PARA ESTRADIOL

Se tomaron 2 alícuotas de 300 μ L (testículos y ovarios) de los extractos mencionados previamente.

Estándares: se prepararon a partir de una solución madre de estradiol (Sigma) de 7,5 μ g/mL en etanol, en un rango de 1,75 a 900 pg por tubo en 300 μ L de *buffer* fosfosalino gelatina.

Antisuero: a los tubos conteniendo la curva y las muestras, se agregaron 100 μ L de anti-estradiol (Niswender #244 anti-estradiol-6 BSA) disuelto en *buffer* fosfosalino gelatina en una dilución de inicial de 1:12500.

Hormona radioactiva: todos los tubos del ensayo recibieron el estradiol tritiado (New England Nuclear), de una actividad específica de aproximadamente 100 Ci/mmol y una pureza radioquímica del 99%, disuelto en *buffer* fosfosalino gelatina (aproximadamente 10.000 cpm/100 μ L). Las muestras y la curva, con el trazador y el anticuerpo se incubaron 24 h 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* fosfosalino, recientemente preparada. Esta suspensión adsorbe la hormona libre. Se agregaron 200 μ L, se agitó con un agitador mecánico y se incubó 10 minutos a 4°C. Luego se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. Finalmente, se tomaron 500 μ L del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 1,5 mL de líquido centelleante (Optiphase Hisafe 3, PerkinElmer, Inc.). Se registró la radiactividad de los viales en un contador beta (Beckman, EEUU) y se analizaron los resultados.

La sensibilidad del ensayo fue de 7,03 pg/ovario y 16.72 pg/testículo, y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 6,8% y 11.7%, respectivamente.

RIA PARA TESTOSTERONA

Se tomaron 2 alícuotas de 50 μ L (testículo), excepto para testículos de ratones de DPN4 que se usaron alícuotas de 10 μ L, o de 200 μ L (ovario) de los extractos mencionados previamente.

Estándares: se prepararon a partir de una solución madre de testosterona (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) de 1 mg/mL en etanol, en un rango de 3.12 a 800 pg por tubo en 200 µL de *buffer* fosfosalino gelatina.

Antisuero: a los tubos conteniendo la curva y las muestras, se agregaron 100 µL de antisuero específico anti-testosterona (Niswender #250 anti-testosterona-11 BSA) disuelto en *buffer* fosfosalino gelatina en una dilución inicial de 1:2000.

Hormona radioactiva: todos los tubos del ensayo recibieron la ³[H]-testosterona (New England Nuclear), de una actividad específica de aproximadamente 100 Ci/mmol y una pureza radioquímica del 99%, disuelto en *buffer* fosfosalino gelatina (aproximadamente 10000 cpm/100 µL). Las muestras y la curva con el trazador y el anticuerpo se incubaron 24 h a 4°C.

Separación de la hormona libre del complejo hormona-anticuerpo: la separación se logró de manera similar a lo descrito para E₂. Se tomaron 400 µL del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 1,5 mL de líquido centelleante. Se registró la radiactividad de los viales en un contador beta. La sensibilidad del ensayo fue de 18.75 pg/ovario y 62.5 pg/testículo. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayos fueron de 7,8% y 12,3% respectivamente.

RIA PARA PROGESTERONA

Se tomaron 2 alícuotas de 500 µL de los extractos de sueros de ratones adultos mencionados previamente.

Estándares: se prepararon a partir de una solución de progesterona de 1 µg/mL (Sigma) en etanol, en un rango de 12,5 a 6400 pg por tubo en 500 µL de *buffer* fosfosalino gelatina.

Antisuero: se agregaron 200 µL de anti-progesterona (Niswender #337 anti-progesterona-1 BSA), disuelta en *buffer* fosfosalino gelatina en una dilución de 1:800 a los tubos conteniendo la curva y las muestras.

Hormona radioactiva: la progesterona tritiada (New England Nuclear) de una actividad específica de aproximadamente 100 Ci/mmol y una pureza radioquímica del 99%, se agregó disuelta en *buffer* fosfosalino gelatina (aproximadamente 10000

cpm/100 μ l), a todos los tubos del ensayo. Las muestras y la curva, con el trazador y el anticuerpo, se incubaron 24 h a 4°C.

Separación de la hormona libre del complejo hormona-anticuerpo: El procedimiento fue similar al descrito para E₂ y T. Finalmente, se toman 700 μ l del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 1,5 mL de líquido centelleante. Se registró la radiactividad de los viales en un contador beta. La sensibilidad del ensayo fue de 0.4 ng/ml y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7,1% y 12,15%, respectivamente.

EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE OVULACIÓN Y RECUENTO DE OVOCITOS EN LA AMPULLA

Se ciclaron hembras adultas WT y GABA_{B1}KO y se sacrificaron en el primer día de estro para evaluar cuáles de ellas habían ovulado y cuáles no. Se obtuvieron los cuernos uterinos y con cuidado se sacaron los oviductos y ovarios, los cuáles se colocaban sobre un portaobjetos y se cubrían con otro haciendo presión. La ovulación positiva se determinó por la presencia de ovocitos secundarios en la ampulla visibles al microscopio óptico. A aquellas hembras que habían ovulado, se les determinó el número de ovocitos presentes en el oviducto.

RECUENTO DE ESTRUCTURAS OVÁRICAS

OBTENCIÓN MUESTRA, INCLUSIÓN Y CORTES

Se sacrificaron hembras adultas WT y GABA_{B1}KO durante la mañana del estro y se recolectó un ovario para incluir en parafina y analizar su histología.

Los ovarios se colocaron en formol al 4% durante toda la noche y al día siguiente se colocaron en ETOH 70° a 4 °C, realizando cambios cada media hora. Esto se repitió 5 veces y se dejaron a 4 °C hasta el día siguiente cuando se realizaron los pasajes en alcoholes de graduación creciente para deshidratar el tejido: ETOH 70° (30 minutos), ETOH 90° (30 minutos), ETOH 96° (30 minutos), ETOH 100° (2 lavados de 30 minutos), ETOH 100°/Xilol (20 minutos), Xilol (30 minutos). Luego, se realizó la inclusión en parafina de los tejidos, colocando los mismos en parafina Paraplast (Leica Microsystems) en estufa a 60 °C durante 90 minutos y posteriormente el armado de los tacos.

Luego se enviaron a realizar los cortes al servicio de microscopía del IBYME. Para prevenir contar dos veces la misma estructura, cortes de 5 μm de espesor fueron colocados con intervalos de 50 μm entre ellos sobre portaobjetos cargados positivamente, de acuerdo al método descrito por Woodruff y col. (Woodruff *et al.* 1990) y se secaron en una placa térmica a 30 $^{\circ}\text{C}$ para luego guardarlos a temperatura ambiente hasta el momento de la tinción con hematoxilina-eosina (HE).

TINCIÓN CON HE

Los cortes de ovario se desparafinaron con Xilol (2 lavados de 2.5 min.), luego se rehidrataron en alcoholes de graduación decreciente: ETOH 100 $^{\circ}$ (2 lavados de 2 min.) y ETOH 96 $^{\circ}$ (2 lavados de 2 min.). Posteriormente se realizaron 2 lavados rápidos en agua. Luego se procedió a la tinción de los núcleos celulares con hematoxilina (Dako) durante 8 min. Se realizó un lavado con agua y se realizó la tinción del citoplasma de las células con Eosina 0.2% (Sigma) durante 2 min. Luego de un lavado con agua se procedió con la deshidratación de los cortes con alcoholes de graduación creciente: ETOH 96 $^{\circ}$ (2 lavados de 1 min.), ETOH 100 $^{\circ}$ (2 lavados de 1 min) y Xilol (2 lavados de 2.5 min.). Finalmente, los cortes se montaron con bálsamo sintético DPX (Sigma).

CONTEO DE ESTRUCTURAS

Los folículos fueron clasificados como folículos primordiales y/o primarios (FP), folículos preantrales (FPA) o folículos antrales tempranos (FAT) de acuerdo a la presencia o ausencia de antro, o folículos preovulatorios (FPO). Los folículos atrésicos (FA) fueron definidos como aquellos en los cuales se observó la presencia de más de 10 núcleos picnóticos por folículo y en los más pequeños, el criterio de atresia fue la presencia de ovocitos degenerado, formación de antro precoz, o ambos criterios (Sadrkhanloo *et al.* 1987; Andreu *et al.* 1998). El número de FP, FPA, FAT, FPO y FA fue determinado en 5 secciones de ovario por cada ovario, 5 ovarios por cada genotipo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados fueron informados y presentados como el promedio \pm error estándar (ES).

Las diferencias entre medias de dos grupos se analizaron mediante la prueba t de Student. Las diferencias entre más de dos grupos se analizaron mediante el Análisis de

la Varianza de 2 o 3 factores, seguido de las prueba *a posteriori* de Tukey HSD para N desiguales o de Newman-Keuls para N iguales.

La distribución de frecuencias en el caso del porcentaje de ovulación se analizó mediante la prueba de χ^2 .

Las correlaciones entre la expresión de genes evaluados en las mismas muestras, se analizaron mediante el estadístico de Correlación de Pearson.

Los datos fueron transformados en los casos en que la prueba para homogeneidad de varianzas y/o de normalidad así lo requirió.

En todos los casos los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

Se utilizaron para los cálculos estadísticos los programas: STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. StatSoft, Inc. (2008), OK, USA (www.statsoft.com); InfoStat versión 2012, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (www.infostat.com.ar).

INTRODUCCIÓN I

Como ya mencionáramos, la reproducción es controlada por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. El GnRH, decapeptido sintetizado por neuronas específicas en el hipotálamo, es un importante regulador de la función reproductiva. La secreción de GnRH ocurre en pulsos discretos, excepto durante el período pre-ovulatorio en las hembras, donde se libera un pico de GnRH, el cual es capaz de inducir los picos pre-ovulatorios de gonadotropinas (Moenter *et al.* 2003; Naftolin *et al.* 2007). La regulación del eje gonadotrófico está dado a través de señales estimuladoras e inhibitorias que convergen en las neuronas GnRH, estas señales pueden ser tanto neurotransmisores, neurohormonas, péptidos periféricos como hormonas esteroideas.

De todos los neurotransmisores involucrados en la regulación de eje reproductivo, el GABA ha sido propuesto como uno de los más importantes (Heger *et al.* 2003; Mitsushima *et al.* 2003; Fujioka *et al.* 2007; Christian & Moenter 2007). El GABA es el neurotransmisor inhibitorio más importante del sistema nervioso en mamíferos adultos y participa en la regulación de la función reproductiva tanto en el sistema nervioso central como en la hipófisis y a nivel gonadal a través de sus receptores GABA_{A/C} y GABA_B. Se ha descrito la presencia de RGABA_A y RGABA_B en neuronas GnRH (Lagrange *et al.* 1996; Garyfallou *et al.* 2006; Sliwowska *et al.* 2006). A través de ellos, el GABA, puede regular directamente la secreción de GnRH o también puede actuar indirectamente inhibiendo interneuronas involucradas en esta regulación, como las kisspeptidérgicas, opiodes, noradrenérgicas, etc (Kalra & Kalra 1981; Donoso *et al.* 1994; Zhang *et al.* 2009; Pielecka-Fortuna & Moenter 2010) y de esta manera participa en el despertar puberal y en el control de la secreción de gonadotropinas en los ciclos estrales (Maffucci & Gore 2009).

Las kisspeptinas, productos del gen *Kiss1* y su receptor, *Kiss1r*, han surgido como integrantes claves en la regulación de la secreción de GnRH. Mutaciones o deleciones dirigidas del receptor de *Kiss1* producen hipogonadismo hipogonadotrófico en humanos y ratones, indicando que la señalización a través de este receptor es un prerrequisito para la maduración sexual. Kisspeptinas administradas en el sistema

nervioso central estimulan la secreción de GnRH y gonadotropinas en animales prepuberales y adultos. Por otro lado las neuronas kisspeptidérgicas son el blanco directo para la retroalimentación positiva y negativa ejercida por los estrógenos, regulando diferencialmente la expresión del ARNm de *Kiss1* en distintas áreas del diencefalo (Kauffman 2010). Además de su ubicación en el hipotálamo y en el área preóptica, se ha encontrado expresión de kisspeptinas y su receptor en la hipófisis y en las gónadas (Ojeda *et al.* 2006; Gottsch *et al.* 2006; Chan *et al.* 2008; Colledge 2008; Roa *et al.* 2008).

Si bien se conoce el rol de GABA y kisspeptinas en la regulación del eje gonadotrófico, se sabe poco sobre la relación entre estos dos factores. Varios grupos han sugerido que las neuronas de *Kiss1* y GABA interactúan en el control de la secreción de GnRH (Neal-Perry *et al.* 2009; Pielecka-Fortuna & Moenter 2010; Garcia-Galiano *et al.* 2012). Además, Cravo y col. demostraron que un alto porcentaje de neuronas *Kiss1* del AVPV (75%) y del ARC (50%) son también positivas para la expresión del ARNm de *Gad1*, enzima de síntesis de GABA (Cravo *et al.* 2011). Recientemente, Kurian y col. demostraron en monos que antes del despertar puberal, y no después, la liberación de GnRH es inhibida por un *tono GABAérgico* a través de neuronas kisspeptidérgicas y que esta acción era ejercida por medio de RGABA_A (Kurian *et al.* 2012). Aunque se sabe que los RGABA_B son capaces de modular la secreción de GnRH, hasta el momento no se ha reportado una relación directa entre los RGABA_B y las neuronas kisspeptidérgicas.

Dado que los ratones GABA_{B1}KO presentan, desde el punto de vista endocrino, principalmente alteraciones en el eje gonadotrófico (Catalano *et al.* 2005) y que las hembras GABA_{B1}KO son las más afectadas, presentando disrupción de los ciclos estrales, la reproducción y la respuesta de las gonadotropinas frente a la castración, postulamos un papel importante para el GABA, a través de sus RGABA_B, en la fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y una posible relación con neuronas *Kiss1* y de GnRH.

OBJETIVO I

En este capítulo nos propusimos estudiar el rol de los RGABA_B en ratones adultos que carecen de RGABA_B funcional (GABA_{B1}KO), evaluando la funcionalidad del eje gonadotrófico en sus distintos niveles: hipotálamo, hipófisis y gónadas.

RESULTADOS I A. EJE GONADOTRÓFICO: HIPOTÁLAMO

COLOCALIZACIÓN DE LOS ARNm DE *KISS1*-RGABA_{B1} (HIS) EN LOS NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS AVPV/PEN Y ARC DE HEMBRAS

Dado que las hembras adultas GABA_{B1}KO presentan alteraciones reproductivas, quisimos, en primer lugar, evaluar si las neuronas *Kiss1* son un posible blanco de acción del neurotransmisor GABA a través del receptor GABA_B. Para ello evaluamos la co-localización de los ARNm de la subunidad RGABA_{B1} y *Kiss1* mediante HIS de marcación doble. Hasta el momento no se ha estudiado esta co-localización y es un dato muy importante que nos ayuda a entender la relación entre GABA y kisspeptina y su acción sobre el eje reproductivo. Para estos estudios utilizamos cerebros de hembras adultas WT en estro y estudiamos la co-localización en las dos áreas hipotalámicas donde se expresa mayoritariamente *Kiss1*, el AVPV/PeN y el ARC. Utilizamos este estadio del ciclo estral dado que las hembras GABA_{B1}KO presentan persistencia en este día del ciclo y por ello va a ser nuestro control a lo largo de esta tesis.

Los resultados indican que un altísimo porcentaje de las neuronas *Kiss1* del AVPV/PeN ($97.7 \pm 0.89 /$) sintetizan el ARNm de la subunidad RGABA_{B1} (Figura 1.1 A). De manera similar, la mayoría de las neuronas *Kiss1* del ARC ($71.3 \pm 4.0 /$) co-expresan la subunidad RGABA_{B1} (Figura 1.1 B).

Esta es la primera vez que se demuestra la presencia de la subunidad RGABA_{B1}, esencial para el correcto funcionamiento del RGABA_B, en las neuronas *Kiss1* en roedores e indica que el GABA puede señalizar directamente sobre estas neuronas a través de sus RGABA_B.

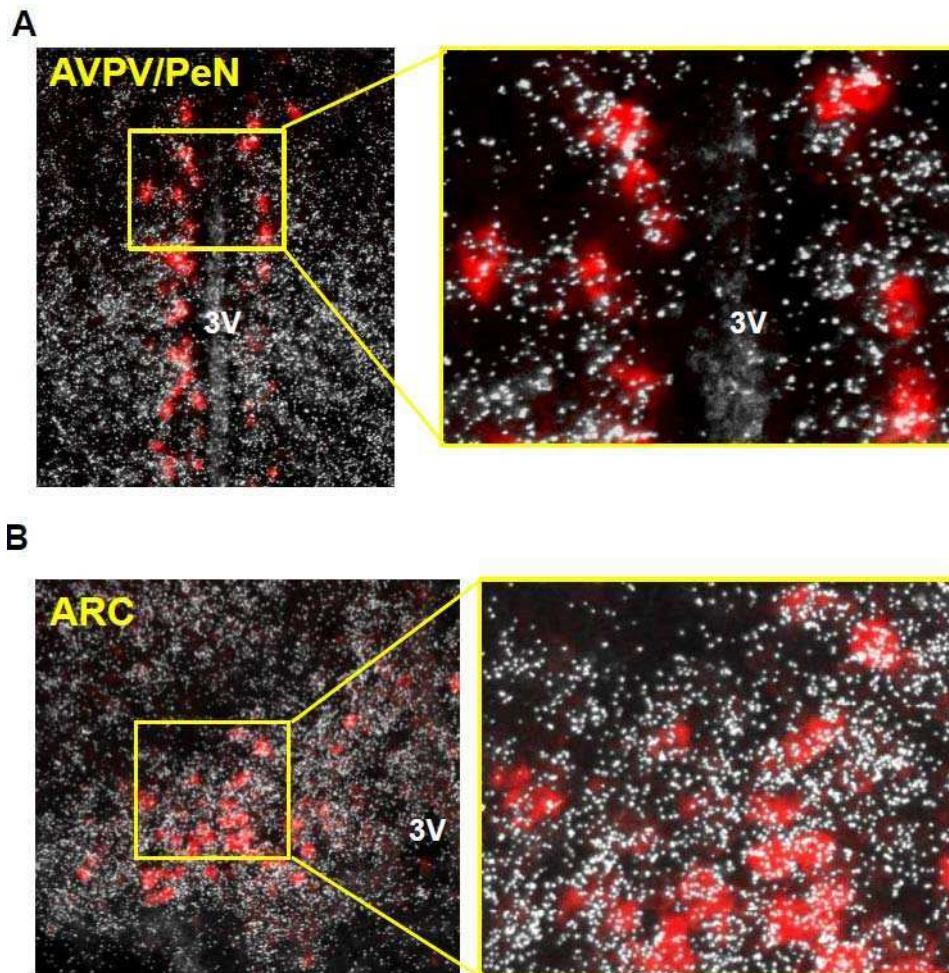


Figura 1.1: Microfotografías representativas de la expresión del ARNm de la subunidad $RGABA_{B1}$ (gránulos blancos) en las neuronas *Kiss1* (fluorescencia roja) del AVPV/PeN (A) y ARC (B) de hembras adultas (HIS). Imágenes de la derecha son ampliaciones del recuadro amarillo marcado en las imágenes de la izquierda. La mayoría de las neuronas *Kiss1* (~97-71%, respectivamente) co-expresan la subunidad $RGABA_{B1}$ en cada región. 3V: 3er ventrículo. N=3.

EXPRESIÓN DE *KISS1* EN LOS NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS AVPV/PEN Y ARC (HIS)

Dado que la falta de $RGABA_B$ podría estar afectando de manera directa la expresión de *Kiss1* y para tener un escenario un poco más completo de la expresión y localización de las neuronas *Kiss1*, realizamos HIS de marcación simple para *Kiss1* en los ratones adultos WT y $GABA_{B1}KO$ de ambos sexos. Evaluamos el número de células *Kiss1* positivas y la expresión de *Kiss1* por célula en el AVPV/PeN y ARC de los diferentes grupos.

En el AVPV/PeN encontramos que las hembras tienen más neuronas *Kiss1* y más expresión de *Kiss1* por célula que los machos ($p < 0.0001$), sin diferencias genotípicas (Figura 1.2). La mayor expresión de *Kiss1* en éste área en las hembras concuerda con la bibliografía (Kauffman *et al.* 2007a; Kauffman *et al.* 2009; Semaan *et al.* 2010).

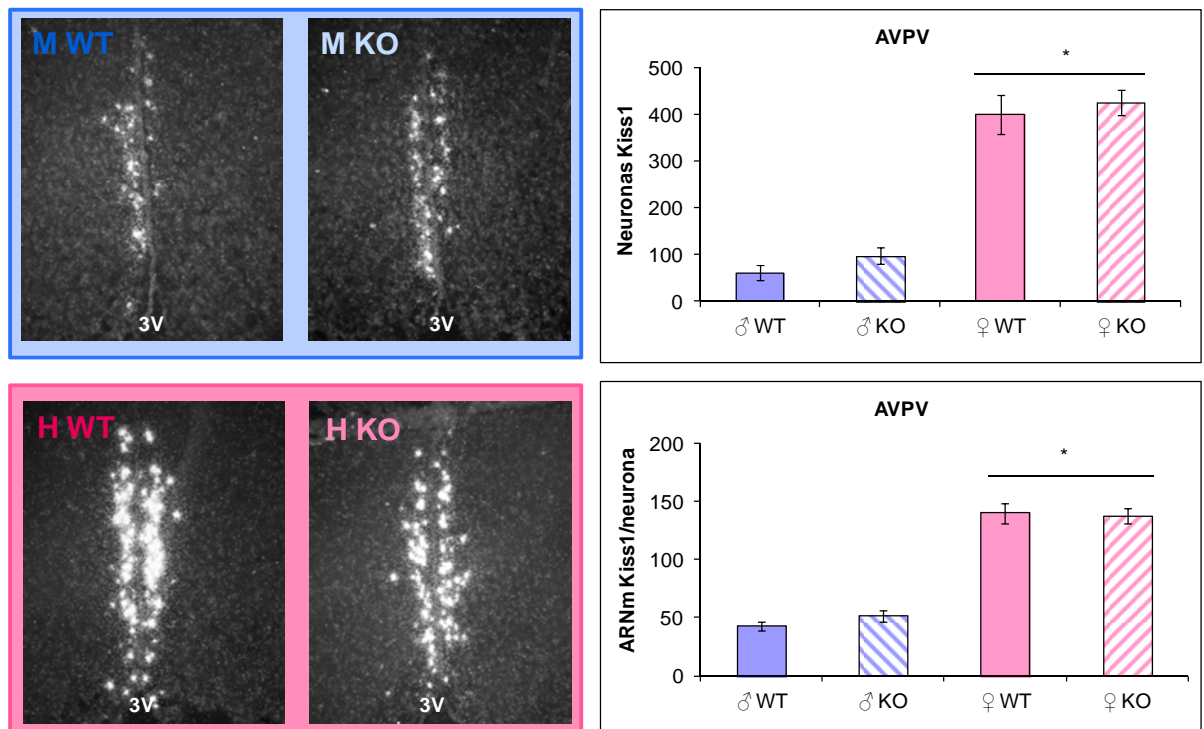


Figura 1.2: Expresión de *Kiss1* en el AVPV/PeN de ratones adultos WT y $GABA_{B1}KO$ (HIS). Izquierda: Microfotografías representativas de la expresión de *Kiss1* en el AVPV/PeN. 3V: 3er ventrículo. Derecha: Promedio del número de neuronas *Kiss1* en el AVPV/PeN (arriba) y de la expresión del ARNm de *Kiss1* por neurona en el AVPV/PeN (abajo). ANOVA en dos sentidos para cada determinación: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.0001$. *: Número de neuronas *Kiss1* o ARNm *Kiss1*/neurona de hembras distinto a *Kiss1* de machos. N=7.

Cuando analizamos el ARC, encontramos que el número de neuronas *Kiss1* fue similar entre los grupos, aunque la expresión de *Kiss1* por célula fue ligeramente, pero significativamente, mayor en hembras que en machos, sin diferencias genotípicas (Figura 1.3).

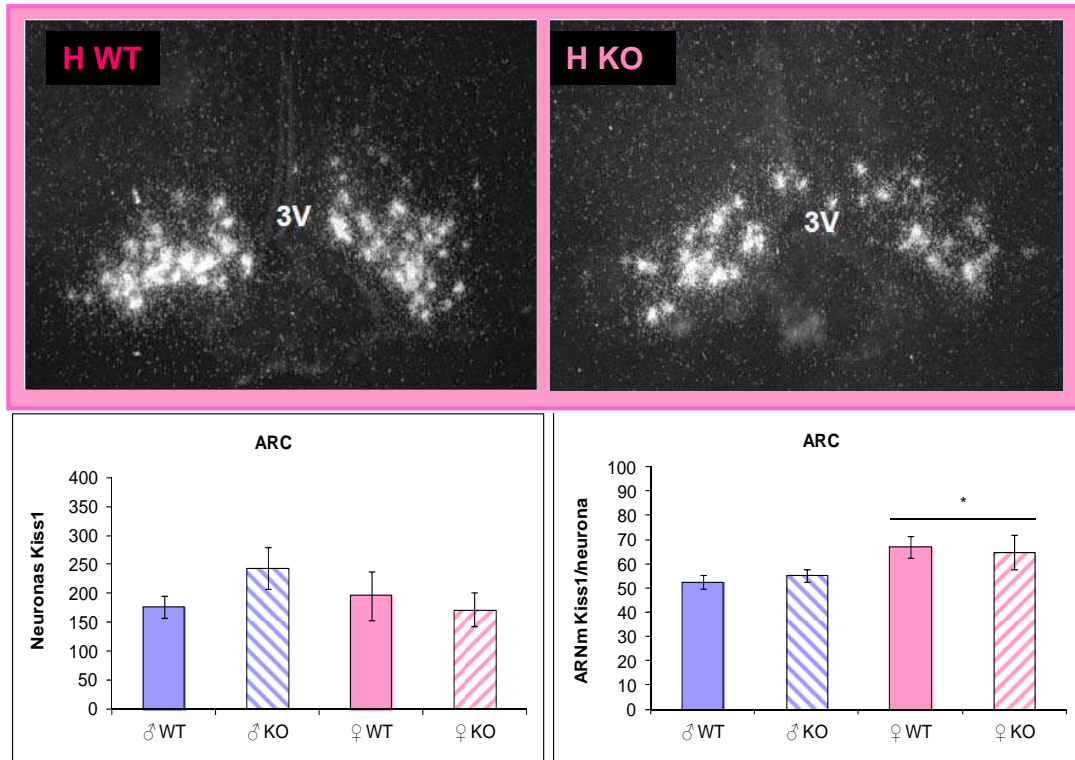


Figura 1.3: Expresión de *Kiss1* en el ARC de ratones adultos WT y $GABA_{B1}KO$ (HIS). Arriba: Microfotografías representativas de la expresión de *Kiss1* en el ARC. 3V: 3er ventrículo. Abajo: Promedio del número de neuronas *Kiss1* en el ARC (izquierda) y de la expresión del ARNm de *Kiss1* por neurona en el ARC (derecha). Número de neuronas *Kiss1*: ANOVA en dos sentidos, NS. ARNm *Kiss1*/neurona: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.02$. *: ARNm *Kiss1*/neurona de hembras distinto a *Kiss1* de machos. N=7.

EXPRESIÓN DE *KISS1* EN LOS NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS AVPV/PEN Y ARC (QPCR)

Para corroborar los resultados obtenidos por HIS, determinamos la expresión de *Kiss1* mediante qPCR en *micropunches* de los núcleos hipotalámicos AVPV/PeN y ARC, una técnica muy sensible que podría detectar diferencias sutiles, no observables por HIS.

La expresión de *Kiss1* en el AVPV/PeN de los ratones adultos fue mayor en hembras que en machos ($p < 0.0001$), sin diferencia genotípica (Figura 1.4 A).

Por otro lado, la expresión de *Kiss1* en el ARC no varió entre los grupos (Figura 1.4 B).

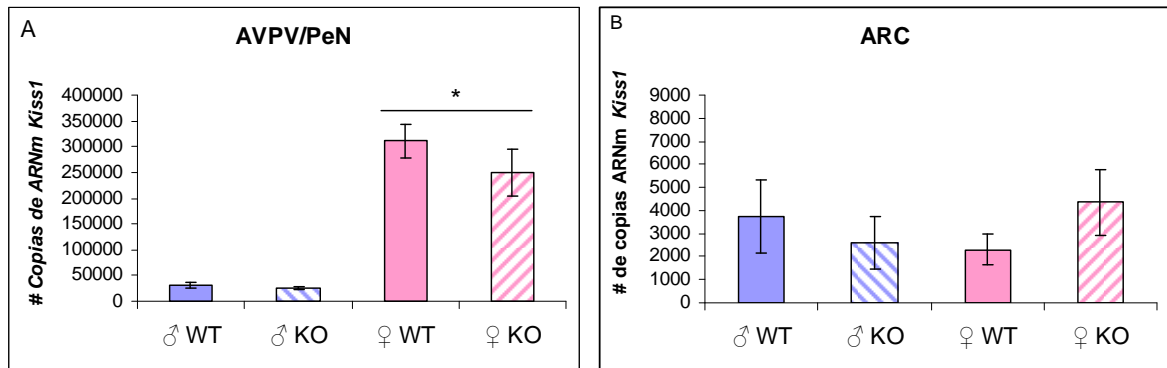


Figura 1.4: Promedio del número de copias del ARNm de *Kiss1* (qPCR) en *mipunches* de AVPV/PeN (A) y ARC (B) tomados a partir de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. AVPV/PeN: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.0001$. *: Número de copias de *Kiss1* de hembras distinto al número de copias de *Kiss1* de machos. ARC: ANOVA en dos sentidos NS. N=5-7.

Estos resultados concuerdan exactamente con los obtenidos mediante HIS. Por lo tanto, la falta de RGABA_B no altera la expresión de *Kiss1* en AVPV/PeN y ARC, dos núcleos importantísimos en la regulación de la secreción de GnRH y del eje reproductivo.

COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE *KISS1* ENTRE LOS NÚCLEOS AVPV/PEN Y ARC EN AMBOS SEXOS Y GENOTIPOS (QPCR)

Luego quisimos comparar el número de copias de *Kiss1* entre los núcleos específicos evaluados en los ratones adultos. Encontramos que tanto los machos como las hembras expresan más *Kiss1* en el AVPV/PeN comparado con el ARC ($p < 0.001$), además de la diferencia sexual ya descrita del AVPV/PeN (Figura 1.5). Es más, la diferencia de expresión entre los núcleos es marcadamente mayor en hembras que en machos (Relación AVPV-PeN/ARC: hembras WT: 135 ± 46 , hembras GABA_{B1}KO: 57 ± 32 , machos WT: 8 ± 3 , machos GABA_{B1}KO: 9 ± 2).

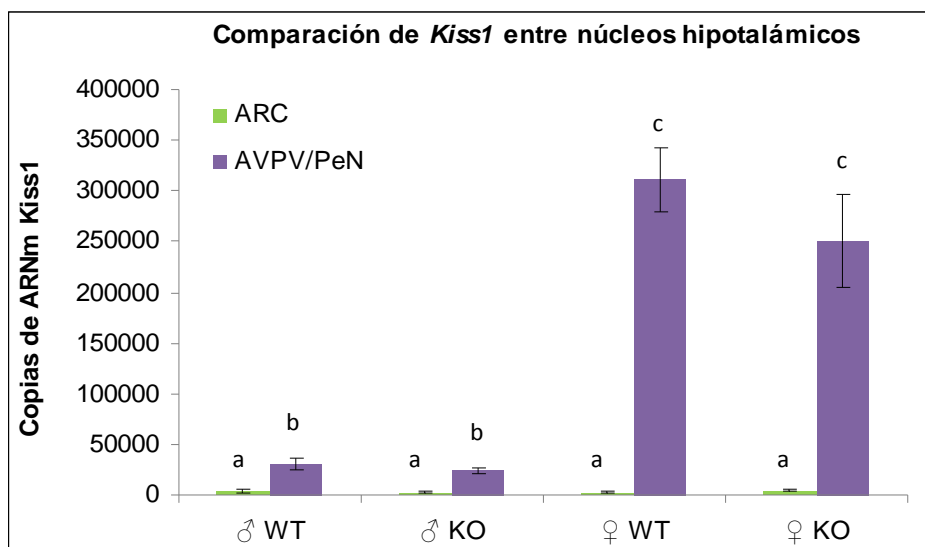


Figura 1.5: Número de copias del ARNm de *Kiss1* (qPCR) en *micropunches* de AVPV/PeN y ARC de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. ANOVA en tres sentidos, interacción triple NS, interacción sexo-área $p < 0.0001$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). N=5-7.

EXPRESIÓN DE *GNRH1* EN ÁREA PREÓPTICA (HIS)

Luego de evaluar, en trabajos previos, el contenido hipotalámico de GnRH y habiendo encontrado disminuida la concentración de GnRH en los ratones GABA_{B1}KO de ambos sexos respecto de los WT, a la vez que se observa mayor contenido de GnRH en machos que en hembras, quisimos evaluar la expresión del ARNm *Gnrh1* en el área preóptica (APO), área en donde se encuentra la mayor parte de las neuronas GnRH, para ver si la falta del receptor GABA_B también afecta la expresión del ARNm del decapeptido.

Decidimos evaluar la expresión de *Gnrh1* en primer lugar con HIS de marcación simple, para determinar tanto el número de neuronas GnRH como la expresión de *Gnrh1* por neurona.

El número de neuronas que expresan *Gnrh1* y la expresión de *Gnrh1* por neurona en el APO no difieren entre los grupos analizados por medio de la técnica de HIS (Figura 1.6).

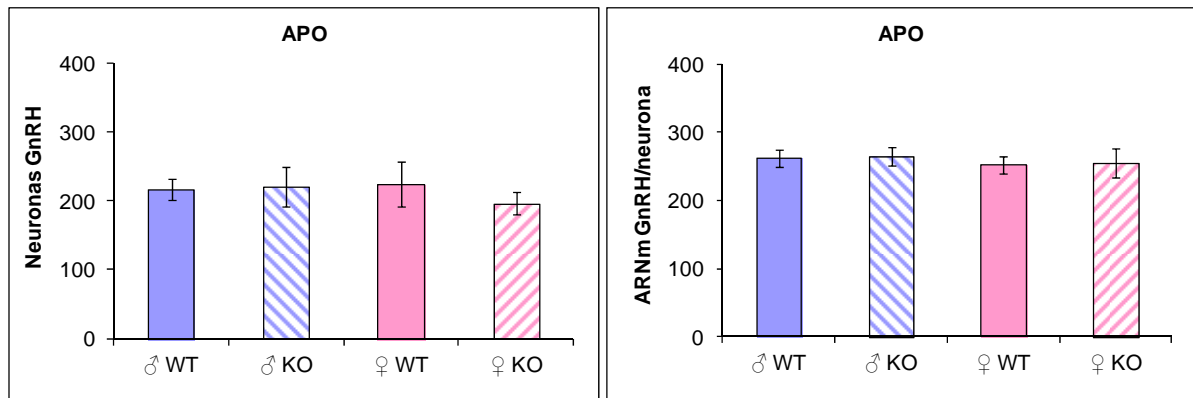


Figura 1.6: Expresión de *Gnrh1* en el APO de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO (HIS). Izquierda: Promedio del número de neuronas GnRH en el APO. Derecha: promedio de la expresión del ARNm de *Gnrh1* por neurona en el área preóptica. ANOVA en dos sentidos para cada determinación: NS. N=7.

EXPRESIÓN DE *GNRH1* EN HIPOTÁLAMO, BULBO OLFATORIO Y CORTEZA (QPCR)

Posteriormente, quisimos evaluar la expresión de *Gnrh1* con qPCR, técnica más sensible que la HIS, en fragmentos hipotalámicos: HA, (conteniendo el APO), HMB (conteniendo el ARC y las fibras y terminaciones nerviosas de las neuronas de GnRH), y BO y CT como áreas controles.

En el hipotálamo anterior se observó que la expresión de *Gnrh1* depende del sexo y del genotipo (ANOVA en 2 sentidos: interacción $p < 0.001$) (Figura 1.7 arriba). *Gnrh1* se expresaba más en machos que en hembras WT. Sin embargo, se encontró una inversión del dimorfismo sexual en los ratones GABA_{B1}KO, los machos GABA_{B1}KO expresan menos *Gnrh1* con respecto a las hembras GABA_{B1}KO.

Cuando se evaluó la expresión de *Gnrh1* en el HMB, se encontraron tanto diferencias sexuales como genotípicas (Figura 1.7 abajo). Los machos presentaron niveles menores de expresión con respecto a las hembras ($p < 0.005$) y los ratones GABA_{B1}KO presentaron mayor expresión que los WT ($p < 0.01$).

Llamativamente, en ambos fragmentos hipotalámicos, las hembras GABA_{B1}KO presentaron un incremento en la expresión de GnRH con respecto a las WT.

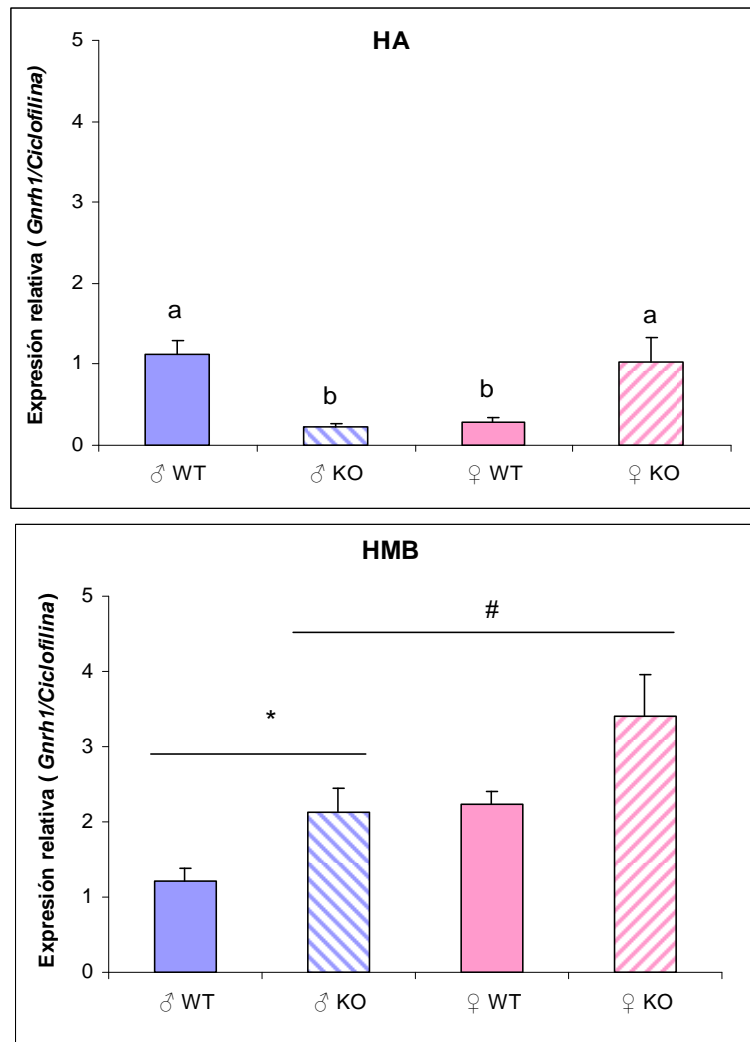


Figura 1.7: Expresión relativa de *Gnrh1* (qPCR) en hipotálamo anterior (arriba) e hipotálamo medio basal (abajo) de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. HA: ANOVA en dos sentidos: interacción p<0.001. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05). HMB: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo: p<0.005, efecto principal genotipo p<0.01.*: *Gnrh1* en HMB de machos distinto de *Gnrh1* en HMB de hembras. #: *Gnrh1* en HMB de ratones WT distinto de *Gnrh1* en HMB de ratones GABA_{B1}KO. N=5-7.

En este caso el resultado difiere del obtenido previamente por HIS y se puede deber a la diferencia en la sensibilidad de los métodos y a la especificidad de las áreas utilizadas en cada caso (APO para HIS y HA (conteniendo el APO) para qPCR). Además se midió la expresión de GnRH en BO y CT, donde fue similar en todos los grupos (Figura 1.8), demostrando que las diferencias observadas en la expresión de GnRH en HT de los animales GABA_{B1}KO son específicas de las áreas involucradas en el control reproductivo.

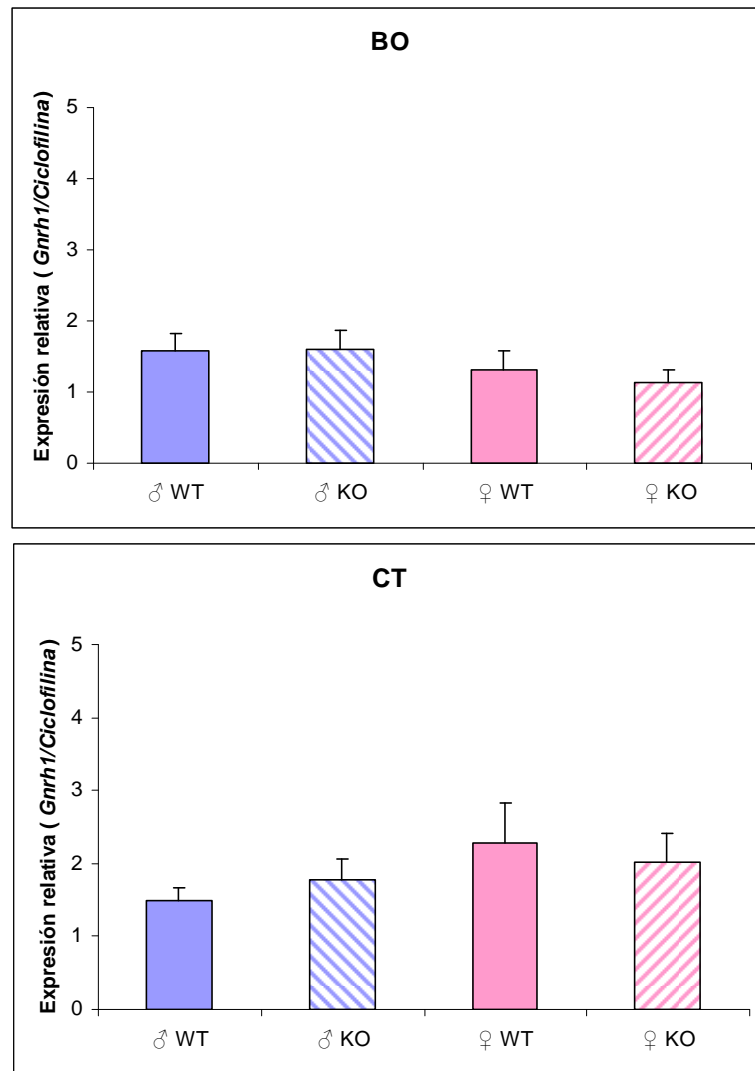


Figura 1.8: Expresión relativa de *Gnrh1* (qPCR) en bulbo olfatorio (arriba) y corteza frontoparietal (abajo) de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. ANOVA en dos sentidos para cada determinación NS. N=7-9.

LIBERACIÓN PULSÁTIL DE GNRH A PARTIR DE EXPLANTOS HIPOTALÁMICOS

Los resultados de contenido de GnRH y de expresión de *Gnrh1* no correlacionaban claramente. Esto se puede deber en parte a que cuando se midió el contenido se lo hizo en HT total, sin separar la parte anterior de la medio basal.

Por lo tanto, para tener una visión más fisiológica de si las diferencias encontradas en la expresión de *Gnrh1* en los animales GABA_{B1}KO llevaban a una secreción diferencial del decapeptido, procedimos a evaluar la frecuencia de pulsatilidad de GnRH a partir de explantos hipotalámicos incubados *in vitro* conteniendo el APO, el hipotálamo anterior y el hipotálamo medio basal, en animales de ambos sexos y genotipos.

La frecuencia de secreción pulsátil de GnRH fue similar entre los sexos en animales WT [GnRH (pulsos/h): Machos WT: 0.80 ± 0.09 vs. Hembras WT: 0.74 ± 0.03 , Test t de Student NS].

Sin embargo, mientras que la frecuencia de pulsatilidad de GnRH no se vio alterada en los machos $GABA_{B1}KO$ con respecto a los WT (Figura 1.10 izquierda), en los hipotálamos de hembras $GABA_{B1}KO$, la frecuencia de pulsatilidad de secreción de GnRH, evaluada en muestras tomadas cada 8,5 minutos, resultó significativamente mayor con respecto a las hembras WT ($p < 0,02$) (Figura 1.10). En la figura 1.10 mostramos perfiles representativos de la liberación pulsátil de GnRH en hembras de ambos genotipos. Es decir que en las hembras $GABA_{B1}KO$ el aumento de expresión del ARNm de *Gnrh1* tanto en el HA como en el HMB llevaría a un aumento en la pulsatilidad del decapeptido.

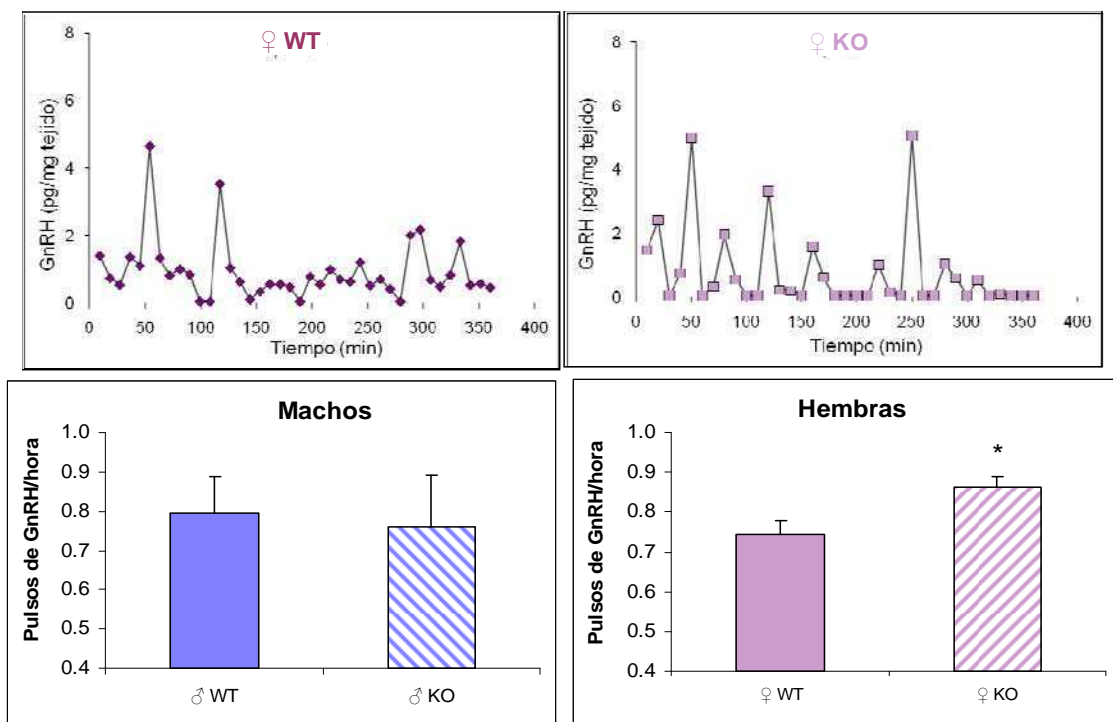


Figura 1.10: Arriba: Perfiles representativos de la secreción pulsátil de GnRH (pg/mg HT) a lo largo del tiempo (minutos) a partir de explantos hipotalámicos incubados *in vitro* de hembras adultas WT (izquierda) y $GABA_{B1}KO$ (derecha). Abajo: frecuencia de pulsatilidad de GnRH secretado (pulsos de GnRH/hora, RIA) a partir de explantos de hipotálamos de machos (izquierda) y hembras (derecha) adultos WT y $GABA_{B1}KO$. Machos: Test t de Student NS. Hembras: Test t de Student, $p < 0,02$. *: pulsos de GnRH/hora en hembras WT diferente de hembras $GABA_{B1}KO$. N=6-7.

El análisis de la pulsatilidad demuestra que las hembras GABA_{B1}KO, además de presentar un incremento en la expresión de *Gnrh1* tanto en el HA como en el HMB, tienen incrementada la frecuencia de pulsatilidad de GnRH. Si bien los niveles basales de gonadotrofinas no mostraron diferencias entre los genotipos (ver resultados de gonadotrofinas séricas en este mismo capítulo), una alteración en la pulsatilidad de GnRH, y por ende de LH, podría ser una de las causas de la alteración encontrada en los ciclos reproductivos, y por tanto comprometer al eje en su conjunto.

LIBERACIÓN PULSÁTIL DE GNRH A PARTIR DE HIPOTÁLAMOS INCUBADOS CON KISS-10 Y/O KISS-234

Dado que en las hembras GABA_{B1}KO sacrificadas en estro encontramos aumentada la pulsatilidad de GnRH, y a pesar que la expresión de *Kiss1* no se encontraba alterada, decidimos evaluar cómo respondía el hipotálamo de las hembras a la estimulación con agonistas y antagonistas del *Kiss1r*. Para ello, hembras ovariectomizadas con reemplazo hormonal de estradiol, se sacrificaron 7 días post-ovariectomía y sus HT se recolectaron para el experimento de pulsatilidad de GnRH, pero en este caso incorporando en el medio de incubación: Kiss-10 (Agonista del *Kiss1r*), Kiss-234 (antagonista del *Kiss1r*), la combinación de ambos o medio Krebs-Ringer como control. Se recolectó el medio de incubación cada 9 minutos durante 7:30 hs y se midió el GnRH secretado en cada punto (RIA). Se decidió utilizar este modelo experimental para independizarnos de los efectos gonadales.

El número de picos de GnRH a lo largo del experimento no varió entre los grupos, sin embargo existe una tendencia a disminuir en el grupo Kiss-10 independientemente del genotipo, que no alcanzó significancia estadística (Figura 1.11). Esto probablemente se deba a que la administración continua de Kiss-10 desensibilizaría al *Kiss1r* como fuera previamente descrito al analizar la pulsatilidad de LH *in vivo* (Seminara *et al.* 2006; Plant & Ramaswamy 2009) o la secreción de GnRH en cultivos de APO (Choe *et al.* 2013). Tampoco presentaron diferencias significativas entre los grupos la duración promedio del pico ni el intervalo promedio entre pulsos (Figura 1.11).

Cuando analizamos la amplitud de los picos (pg GnRH/mg HT, Figura 1.11) encontramos que este parámetro depende del genotipo y del tratamiento (ANOVA en

dos sentidos: interacción $p < 0.05$). En las hembras WT, encontramos que todos los tratamientos disminuyen la amplitud del pico con respecto al control ($p < 0.05$). Esto está de acuerdo con lo mencionado anteriormente, que la administración de Kiss-10 desensibilizaría al *Kiss1r*. Además la incubación con Kiss-234 sólo o la combinación del antagonista con Kiss-10 logra inhibir los efectos de la kisspeptina endógena.

Sorpresivamente, aunque la frecuencia de liberación de GnRH fue similar entre los genotipos y tratamientos, encontramos que los hipotálamos de hembras $GABA_{B1}KO$ incubados con Kiss-10 presentaban pulsos de aproximadamente 4 veces mayor amplitud con respecto a las hembras WT del mismo grupo ($p < 0.03$). La amplitud de los pulsos de GnRH de los HT $GABA_{B1}KO$ -Kiss10 presentaba, además, una tendencia, que no logró significancia estadística, a ser mayor que las hembras $GABA_{B1}KO$ control ($p = 0.17$). El antagonista no logró inhibir los efectos de la kisspeptina endógena, ya que la amplitud del pico en los hipotálamos de hembras $GABA_{B1}KO$ incubados con Kiss-234 fue mayor al de los hipotálamos WT ($p < 0.03$).

También analizamos la masa de GnRH secretada por pulso (pg/mg HT, Figura 1.11), la cual tiene relación directa con la amplitud, y observamos que depende del genotipo y el tratamiento (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.05$). Los hipotálamos de hembras WT no presentaron diferencias significativas en la masa secretada debido al tratamiento, aunque se observa una clara tendencia a disminuir con respecto al grupo WT control (similar a lo observado en la amplitud). En este caso, nuevamente los hipotálamos $GABA_{B1}KO$ secretaron mayor masa de GnRH por pulso con respecto a los WT cuando fueron incubados con Kiss-10 ($p < 0.01$) y marginalmente con respecto a los hipotálamos $GABA_{B1}KO$ control ($p = 0.09$), coincidiendo con el aumento de amplitud encontrado.

En la Figura 1.11 se muestran dos perfiles representativos del GnRH secretado por los hipotálamos de hembras WT y $GABA_{B1}KO$ estimulados con Kiss-10 a lo largo del tiempo. En ellos puede observarse claramente la diferencia de amplitud encontrada en los pulsos que da lugar a la diferencia en la masa secretada por pulso.

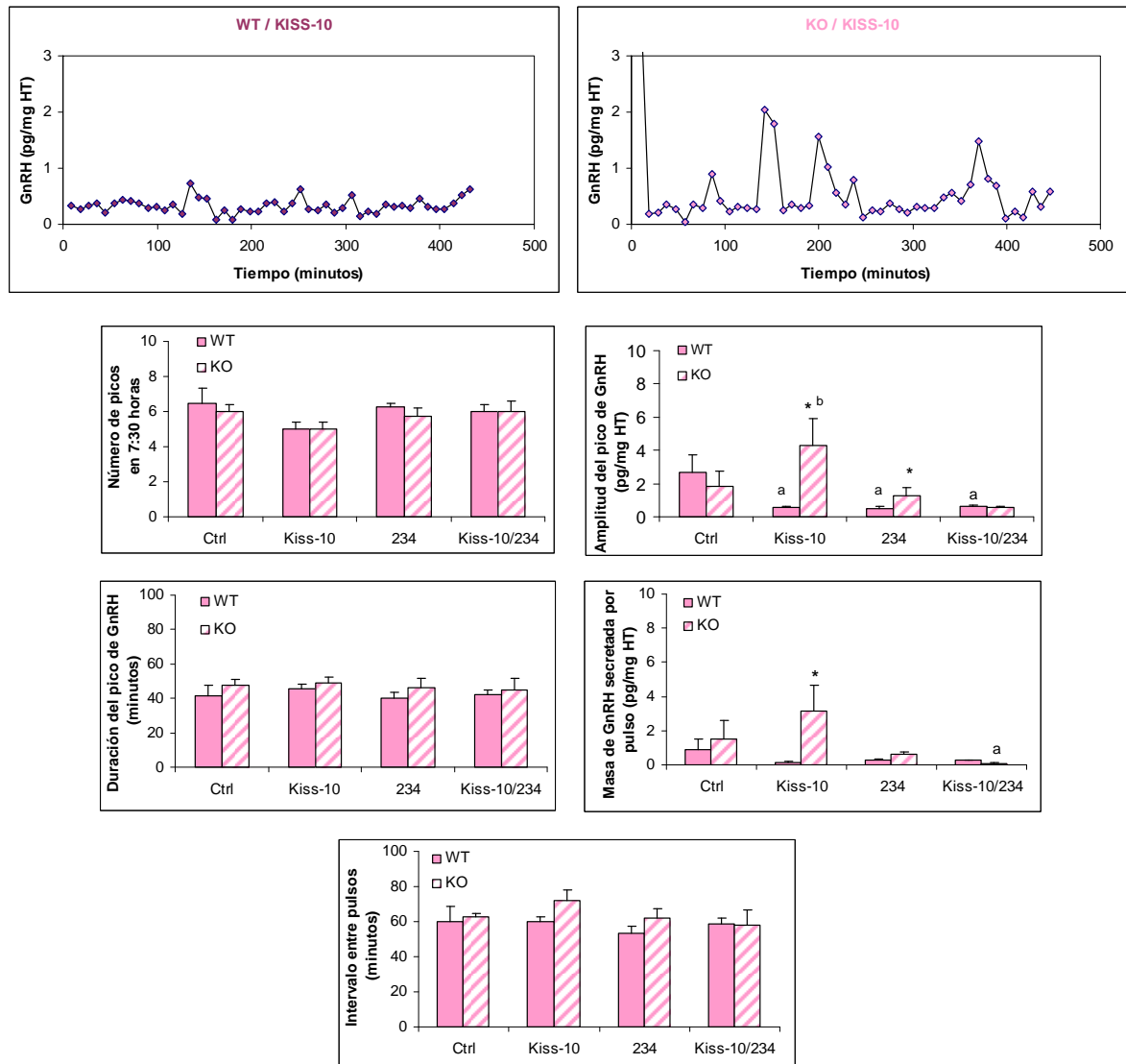


Figura 1.11: Arriba: Perfiles representativos de la secreción pulsátil de GnRH (pg/mg HT) a lo largo del tiempo (minutos) a partir de explantos hipotalámicos incubados *in vitro* de hembras adultas (castradas con reemplazo hormonal) WT (izquierda) y GABA_{B1}KO (derecha) incubadas con Kiss-10. Abajo: Número de picos en 7.30 hs, duración del pico e intervalo entre pulsos (izquierda y abajo) (ANOVA en dos sentidos para cada parámetro evaluado: NS). Amplitud del pico de GnRH (arriba, derecha): ANOVA en dos sentidos: interacción p<0.05; *: distinto de WT de su mismo grupo, p<0.03; a: distinto de WT control, p<0.05; b: distinto de KO Kiss-10/234, p<0.03. Masa de GnRH secretada por pulso (medio, derecha): ANOVA en dos sentidos: interacción p<0.05; *: distinto de WT del mismo grupo, p<0.01; a: distinto de KO del resto de los tratamientos, p<0.05. N=4.

Estos resultados demostrarían que el hipotálamo de las hembras GABA_{B1}KO responde de manera distinta a la estimulación con Kiss-10 y probablemente podría estar asociado a una diferencia a nivel de expresión, mecanismo de desensibilización y/o a la señalización del *Kiss1r*.

Para evaluar si las diferencias encontradas en ratones GABA_{B1}KO adultos en la expresión de *Gnrh1* y la pulsatilidad de GnRH podían deberse a alteraciones a nivel del sistema GABAérgico, dado que no observamos diferencias en *Kiss1*, estudiamos la expresión de la enzima glutamato decarboxilasa (*Gad1*, predominante en ratón), la cual convierte glutamato en GABA, tanto en fragmentos hipotalámicos (HA y HMB) como en CT, como tejido control.

Al igual que con *Gnrh1*, la expresión de *Gad1* en HA depende del sexo y del genotipo (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.001$). La expresión de *Gad1* fue sexualmente dimórfica en ratones WT, siendo mayor en los machos con respecto a las hembras ($p < 0.01$). Sin embargo, los ratones GABA_{B1}KO no presentaron diferencias sexuales, aunque las hembras GABA_{B1}KO tenían expresión de *Gad1* aumentada con respecto a las hembras WT ($p < 0.03$). Si bien los machos no presentaron diferencias genotípicas significativas, existe una tendencia a la disminución de la expresión de *Gad1* en los machos GABA_{B1}KO con respecto a los WT ($p = 0.09$) (Figura 1.12 arriba).

En HMB, *Gad1* se encontró aumentado en los ratones GABA_{B1}KO respecto a los WT ($p < 0.001$), sin diferencias entre sexos (Figura 1.12 centro).

Además, la expresión de *Gad1* en CT también depende del sexo y del genotipo (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$). *Gad1* estaba aumentado en hembras WT respecto a machos WT ($p < 0.05$), mientras que esta diferencia sexual se perdió en los ratones GABA_{B1}KO (Figura 1.12 abajo).

Estos resultados demuestran que cada área analizada tiene un patrón particular de expresión de *Gad1*, pero en las hembras GABA_{B1}KO se observó aumento de la expresión de este gen en ambas áreas hipotalámicas, similar a lo observado para *Gnrh1*.

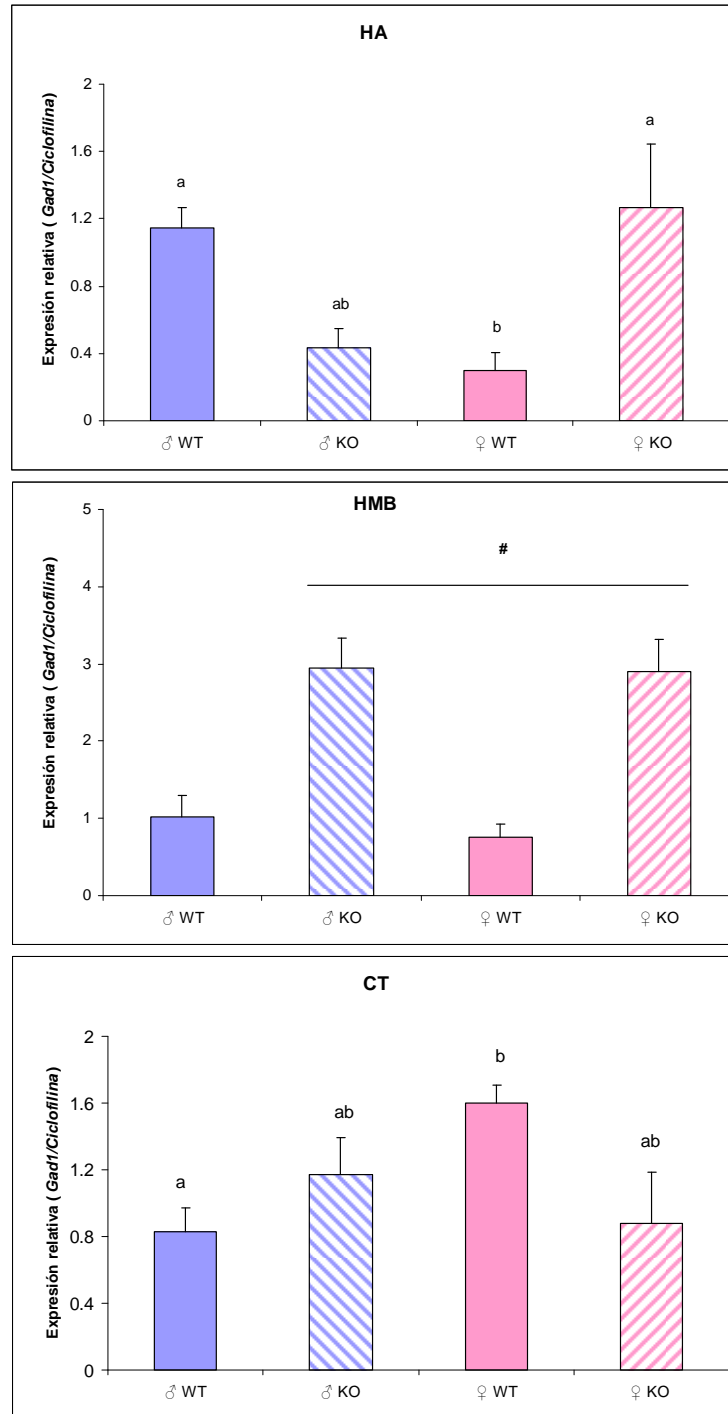


Figura 1.12: Expresión relativa de *Gad1* (qPCR) en hipotálamo anterior (arriba), hipotálamo medio basal (centro) y corteza frontoparietal (abajo) de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. HA: ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.001$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). HMB: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal genotipo $p < 0.001$. #: *Gad1* en HMB de ratones GABA_{B1}KO distinto de *Gad1* en HMB de ratones WT. CT: ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). N=4-8.

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE *GNRH1* Y *GAD1* EN HIPOTÁLAMO

Dado que los patrones encontrados en HA y HMB son similares para *Gnrh1* y *Gad1*, quisimos evaluar si existía algún tipo de correlación entre la expresión de ambos genes en cada área.

Encontramos que en HA existe una asociación lineal positiva o directa entre la expresión de *Gnrh1* y *Gad1* (Coeficiente de correlación de Pearson, $r=0.72$, $p=0.00015$) (Figura 1.13 izquierda), mientras que en HMB no existe tal correlación (Coeficiente de correlación de Pearson, $r=-0.35$, $p=0.15$) (Figura 1.12 derecha), demostrando una asociación entre *Gad1* y *Gnrh1* específica de área.

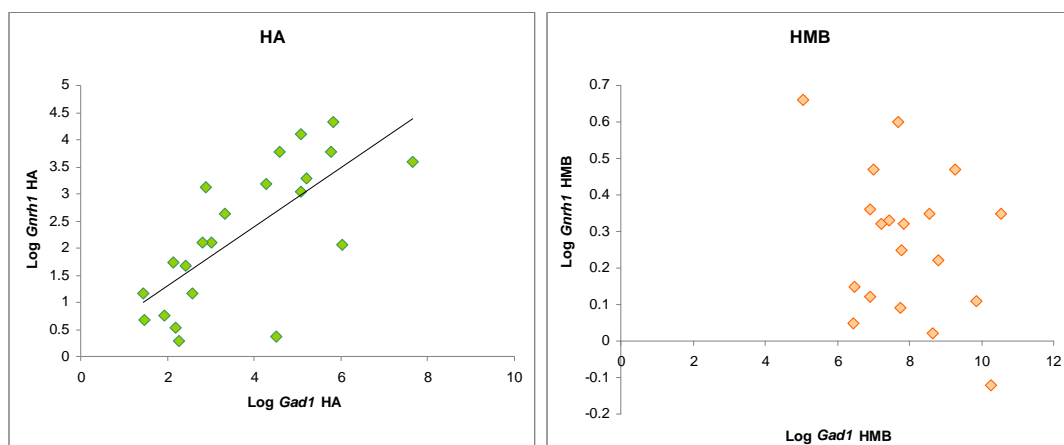


Figura 1.13: Gráficos de correlación entre *Gnrh1* y *Gad1* en hipotálamo anterior (izquierda) e hipotálamo medio basal (derecha) de ratones adultos WT y $GABA_{B1}KO$. HA: Coeficiente de correlación de Pearson, $r=0.72$, $p=0.00015$. HMB: Coeficiente de correlación de Pearson NS.

CONTENIDO AMINOACÍDICO: GABA, GLUTAMATO Y TAURINA (HPLC)

Para evaluar si las diferencias en la expresión de *Gad1* en HT de ratones $GABA_{B1}KO$ llevaban a cambios en el contenido hipotalámico de GABA y si este neurotransmisor, a su vez, podría participar en las alteraciones de la expresión hipotalámica del ARNm de *Gnrh1* y la pulsatilidad de GnRH en ratones $GABA_{B1}KO$, determinamos los contenidos de GABA (inhibitorio), glutamato (precursor del GABA y excitatorio) y taurina (inhibitorio) por HPLC en hipotálamo y corteza frontoparietal (como tejido control), dado que estos tres neurotransmisores se miden conjuntamente por HPLC desde las mismas muestras. Además, el glutamato es también un importante modulador de GnRH.

El contenido HT de GABA depende del sexo y del genotipo (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.05$). En los ratones WT se encontró una clara diferencia sexual, donde los machos presentaron niveles más altos de GABA con respecto a las hembras ($p < 0.02$). Mientras que entre los machos no se observaron diferencias genotípicas, las hembras GABA_{B1}KO presentaron niveles mayores de GABA (similares a los de macho) con respecto a las hembras WT ($p < 0.04$) (Tabla 1.1), perdiéndose de esta manera la diferencia sexual observada en los WT.

El contenido hipotalámico de glutamato mostró un patrón similar al observado para GABA (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.05$). Se observó la misma diferencia sexual en el contenido de glutamato en los ratones WT, los machos presentaron mayores niveles que las hembras ($p < 0.01$), y la diferencia sexual se perdió en los GABA_{B1}KO. Interesantemente, las hembras GABA_{B1}KO presentaron un aumento significativo en los niveles de glutamato hipotalámico con respecto a las hembras WT ($p < 0.04$) (Tabla 1.1), al igual que lo observado para GABA.

Los niveles hipotalámicos de taurina mostraron un patrón similar a los anteriores, sin embargo el análisis estadístico determinó sólo una diferencia sexual, en donde los niveles de los machos resultaron mayores que los de hembras en ambos genotipos ($p < 0.001$) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Contenido de los neurotransmisores GABA, glutamato y taurina (nmoles/mg tejido) en hipotálamo de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO (HPLC). GABA y glutamato: ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.05$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Taurina: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo: $p < 0.001$. *: Contenido hipotalámico de taurina en hembras distinto de contenido de taurina en machos. N=6-12.

HT	♂ WT	♂ KO	♀ WT	♀ KO
GABA (nmoles/mg tejido)	9.44 ± 0.40 a	9.85 ± 0.43 a	6.60 ± 0.43 b	8.99 ± 0.43 a
Glutamato (nmoles/mg tejido)	15.08 ± 0.86 a	14.56 ± 0.70 a	10.93 ± 0.75 b	13.20 ± 0.64 a
Taurina (nmoles/mg tejido)	8.48 ± 0.45	8.90 ± 0.34	6.05 ± 0.56 *	7.13 ± 0.41 *

Además de evaluar el contenido de los neurotransmisores en HT, también lo hicimos en CT. Con respecto al contenido de GABA en CT, encontramos que presentó una diferencia sexual, machos mayor a hembras ($p < 0.001$), y además que los ratones WT

tenían menor contenido de GABA con respecto a los GABA_{B1}KO ($p < 0.03$) (Tabla 1.2). El contenido de glutamato en corteza no presentó diferencias entre los grupos (Tabla 1.2). De manera similar al contenido de GABA en CT, el contenido de taurina en este tejido resultó aumentado en los ratones GABA_{B1}KO con respecto a los WT ($p < 0.01$), aunque fue similar entre sexos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Contenido de los neurotransmisores GABA, glutamato y taurina (nmoles/mg tejido) en corteza frontoparietal (CT) de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO (HPLC). GABA: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.001$, efecto principal genotipo $p < 0.03$. *: GABA en machos distinto de GABA en hembras. #: GABA en ratones WT distinto de GABA en ratones GABA_{B1}KO. Glutamato: ANOVA en dos sentidos NS. Taurina: ANOVA en dos sentidos, interacción NS, efecto principal genotipo $p < 0.01$. #: Taurina en ratones WT distinto de taurina en ratones GABA_{B1}KO. N=6-12.

CT	♂ WT	♂ KO	♀ WT	♀ KO
GABA (nmoles/mg tejido)	3.60 ± 0.15 *	4.07 ± 0.20 * #	2.74 ± 0.15	3.14 ± 0.14 #
Glutamato (nmoles/mg tejido)	13.95 ± 0.48	12.76 ± 0.62	12.55 ± 0.61	13.78 ± 0.64
Taurina (nmoles/mg tejido)	10.52 ± 0.23	11.93 ± 0.31 #	9.47 ± 0.26	12.15 ± 0.28 #

Nuevamente observamos que el patrón particular de contenido de GABA y glutamato en las hembras GABA_{B1}KO en HT es específico de esta área, ya que no se observa en la corteza tomada como tejido control.

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO Y AROMATASA EN HIPOTÁLAMO (QPCR)

La regulación de la secreción de GnRH en la hembra depende en gran medida de la retroalimentación, positiva y negativa, ejercida por los estrógenos. Estos pueden actuar directamente sobre las neuronas de GnRH, dado que se ha reportado la presencia de varios tipos de receptores para estradiol en ellas (receptor α , receptor β y el de membrana GP130 (Waters *et al.* 2001) y también actuando a través de interneuronas como las kisspeptidérgicas, GABAérgicas, glutamatérgicas, etc, como sostenía la fisiología clásica.

Dado que no encontramos alteraciones genotípicas en la expresión de *Kiss1* en los núcleos hipotalámicos evaluados, pero observamos diferencias en la expresión de *Gnrh1* y *Gad1* en HA y HMB, quisimos evaluar si variaciones en la síntesis y/o

sensibilidad al E₂ podrían estar involucradas en áreas donde se encuentran neuronas que regulan la síntesis y secreción de GnRH y que son sensibles a E₂ como las arriba mencionadas.

Para ello, evaluamos como primera aproximación la expresión del receptor de estrógeno α (*Er1*) y de *aromatasa* (*Cyp19a1*, enzima que convierte testosterona a estradiol) en HA y HMB.

En cuanto a la expresión de *Er1* tanto en HA como en HMB, encontramos que la expresión era mayor en hembras que en machos ($p < 0.01$), en concordancia con antecedentes previos (Kudwa *et al.* 2006; Walker *et al.* 2012; Kelly *et al.* 2013). Además encontramos que los ratones GABA_{B1}KO expresaban más *Er1* con respecto a los WT ($p < 0.02$) (Figura 1.14).

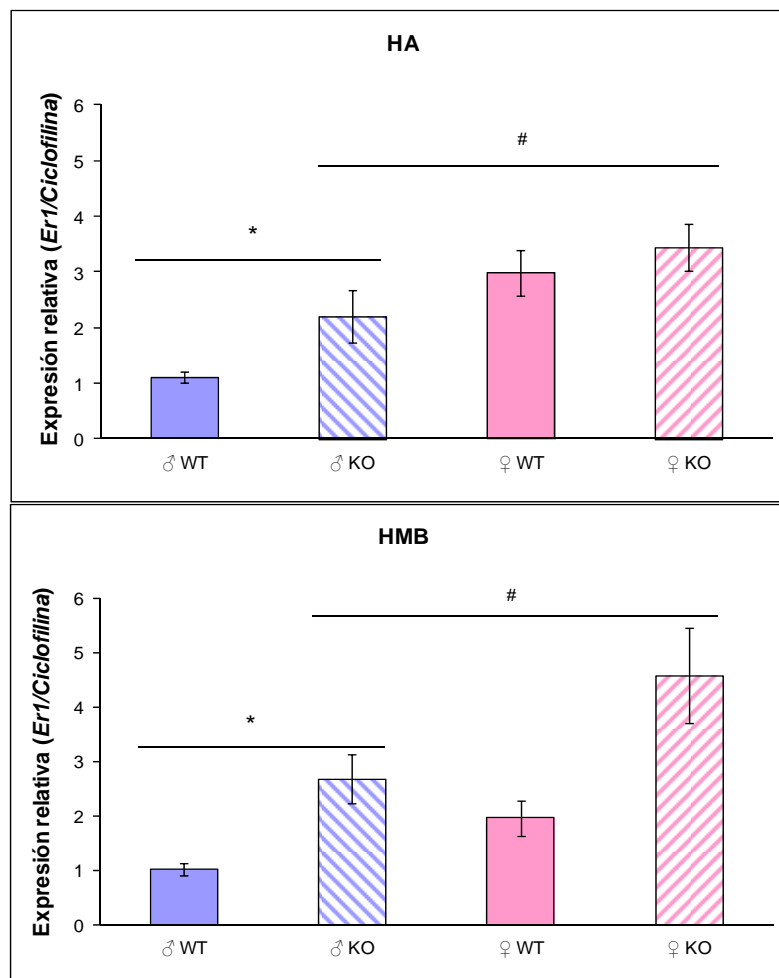


Figura 1.14: Expresión relativa de *Er1* (qPCR) en hipotálamo anterior (arriba) e hipotálamo medio basal (abajo) en ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. HA: ANOVA en 2 sentidos, interacción NS, efecto principal sexo: $p < 0.0001$, efecto principal genotipo $p < 0.02$. HMB: ANOVA en 2 sentidos, interacción NS, efecto principal sexo: $p < 0.01$, efecto principal genotipo $p < 0.0001$. *: *Er1* en machos distinto de *Er1* en hembras. #: *Er1* en ratones WT distinto de *Er1* en ratones GABA_{B1}KO. N=6-10.

Este resultado podría implicar un aumento en la sensibilidad al estradiol de neuronas hipotalámicas, aunque con estos resultados no podemos confirmar qué población de neuronas se verían afectadas.

Por otro lado, evaluamos la expresión de aromatasa (*Cyp19a1*) en hipotálamo de ratones adultos de ambos sexos y genotipos. En HA encontramos que la expresión de *Cyp19a1* es mayor en machos que en hembras ($p < 0.001$), sin diferencias genotípicas (Figura 1.15 arriba). En cuanto a la expresión de *Cyp19a1* en HMB, encontramos el mismo resultado que para HA, machos poseen mayor expresión con respecto a las hembras ($p < 0.003$), sin diferencias genotípicas (Figura 1.15 abajo). Estos resultados concuerdan con resultados previos de la literatura en donde se observó tanto una mayor expresión como actividad de aromatasa en machos con respecto a hembras (Lephart 1996; Roselli *et al.* 1997; Roselli & Klosterman 1998).

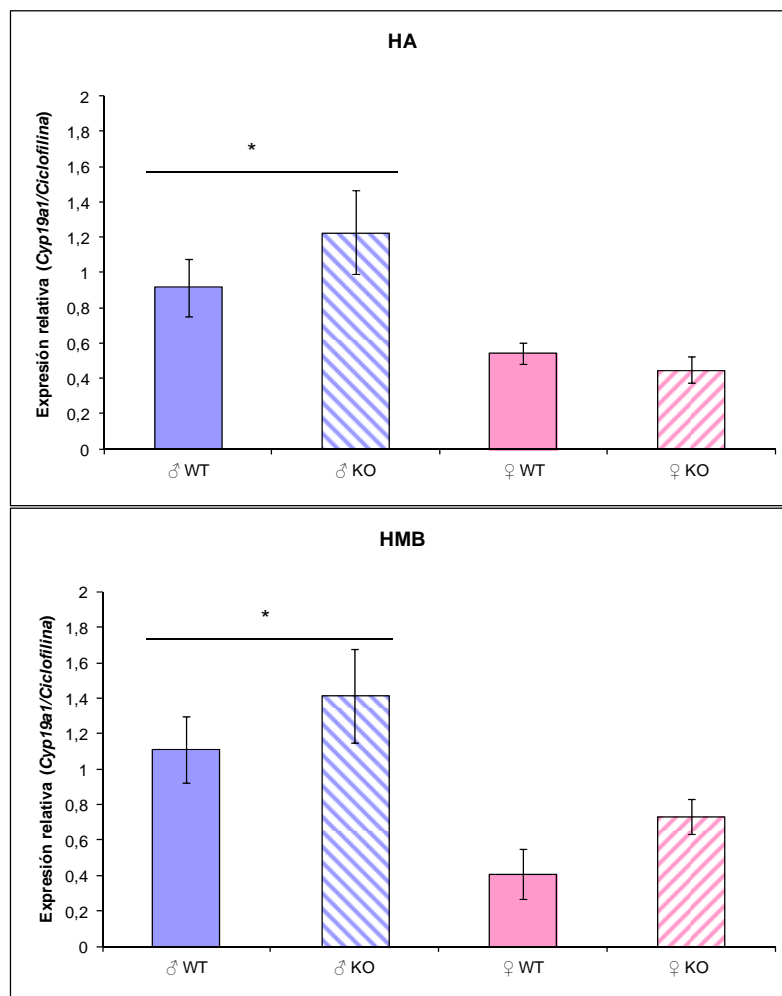


Figura 1.15: Expresión relativa de *Cyp19a1* (qPCR) en hipotálamo anterior (arriba) e hipotálamo medio basal (abajo) en ratones adultos WT y $GABA_{B1}$ KO. HA: ANOVA en dos sentidos, interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.001$. HMB: ANOVA en dos sentidos, interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.003$.

*: *Cyp19a1* en machos distinto de *Cyp19a1* en hembras. N=5-8.

Por lo tanto la expresión de la enzima que convierte testosterona a estradiol en los tejidos blanco, no se encontraría alterada por la falta del RGABA_B, sin embargo no podemos afirmar si la traducción o la actividad enzimática se encuentran afectadas.

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN LOS NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS AVPV/PEN Y ARC (QPCR)

Dado que estradiol proveniente de las gónadas o de síntesis local es un importante regulador de la expresión de *Kiss1* pero también de otros genes involucrados en el eje gonadotrófico, quisimos evaluar la expresión del receptor de progesterona (*Pgr*) en *micropunches* de AVPV/PeN y ARC por qPCR. La expresión de *Pgr* se utiliza habitualmente como marcador de los niveles y señalización de estradiol.

En el núcleo AVPV/PeN encontramos que la expresión de *Pgr* depende del sexo y del genotipo (ANOVA en dos sentidos, interacción $p < 0.01$). Observamos que la expresión de *Pgr* era sexualmente dimórfica en los ratones WT (machos mayor a hembras, $p < 0.03$) y que esta diferencia sexual se pierde en los ratones GABA_{B1}KO. Además, las hembras GABA_{B1}KO presentaron mayor expresión de *Pgr* con respecto a las WT ($p < 0.04$) (Figura 1.16 arriba).

Con respecto a la expresión en el ARC, encontramos que los ratones GABA_{B1}KO poseen menor expresión que los WT ($p < 0.03$), sin diferencias sexuales (Figura 1.16 abajo).

Alteraciones en la expresión de los *Pgr* podrían estar relacionadas a alteraciones en el gatillado del pico preovulatorio de LH, dado que se ha demostrado que frente a la estimulación sólo con estrógenos el pico de LH es incompleto (Attardi & Happe 1986).

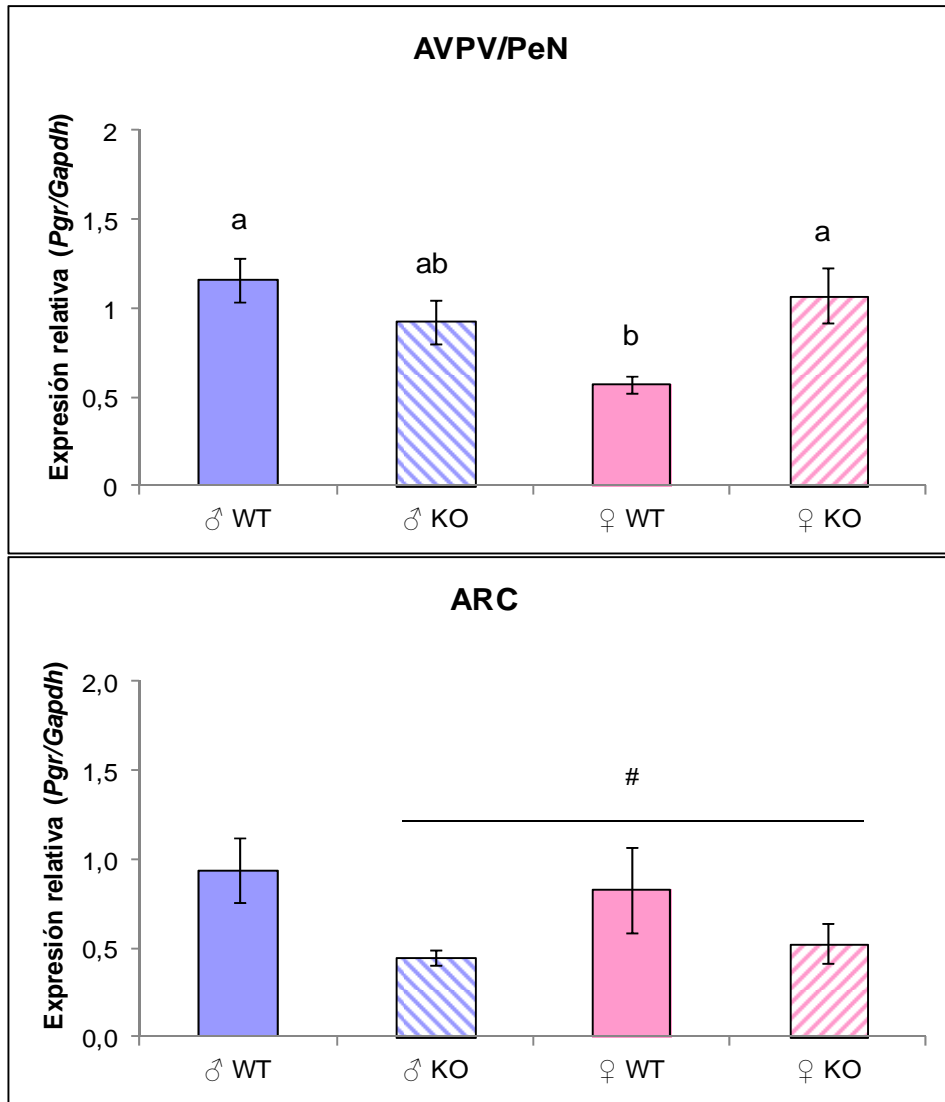


Figura 1.16: Expresión relativa de *Pgr* (qPCR) en micropunches de los núcleos hipotalámicos AVPV/PeN (arriba) y ARC (abajo) de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. AVPV/PeN: ANOVA en dos sentidos: interacción p<0.01. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05). ARC: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal genotipo p<0.03. #: *Pgr* en ARC de ratones WT distinto de *Pgr* en ARC de ratones GABA_{B1}KO. N=5-7.

EXPRESIÓN DE TIROSINA HIDROXILASA EN LOS NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS AVPV/PEN Y ARC (QPCR)

También decidimos evaluar la expresión de otro gen sexualmente dimórfico del cerebro, como lo es la tirosina hidroxilasa (*Th*) para comparar su patrón de expresión con el de los genes ya analizados, es decir para evaluar si la falta del RGABA_B afecta también a otros genes dimórficos o afecta algunos genes en particular como *Gnrh1* y *Gad1*.

Por lo tanto, medimos su expresión por qPCR en los mismos núcleos dónde evaluamos *Kiss1*. En el AVPV/PeN encontramos que los animales WT presentaban

dimorfismo sexual, siendo la expresión de *Th* mayor en las hembras que en los machos ($p < 0.02$), en concordancia con resultados previos (Simerly *et al.* 1985; Simerly 1989; Semaan *et al.* 2010). Esta diferencia sexual se perdió en los ratones GABA_{B1}KO (Figura 1.17 arriba). Por otro lado, en el ARC encontramos un dimorfismo sexual inverso con respecto al AVPV/PeN en los ratones WT ($p < 0.01$), sin diferencias genotípicas (Figura 1.17 abajo).

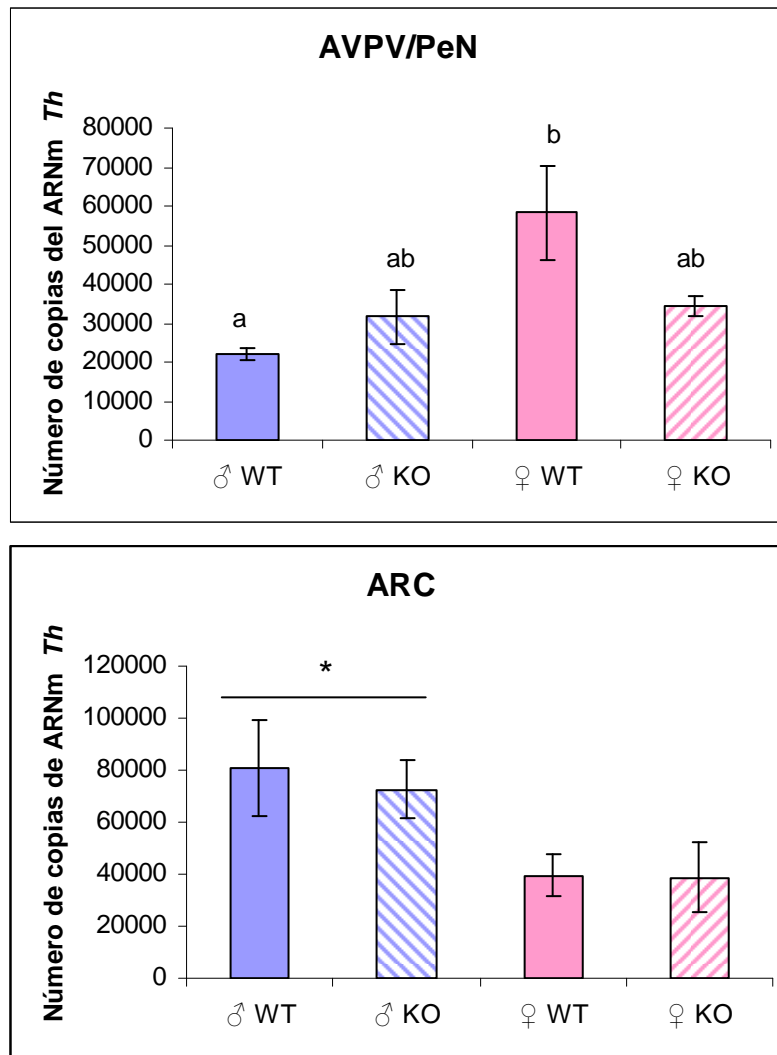


Figura 1.17: Promedio del número de copias del ARNm de *Th* (qPCR) en *micropunches* de AVPV/PeN (arriba) y ARC (abajo) tomados a partir de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. AVPV/PeN: ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.04$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). ARC: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.01$. *: *Th* en machos distinto de *Th* en hembras N=4-7.

Luego comparamos los niveles de expresión de *Th* entre los núcleos hipotalámicos evaluados y observamos que los machos presentaron mayor expresión en el ARC con

respecto al AVPV ($p < 0.03$), mientras que las hembras presentan similar expresión de *Th* en ambos núcleos hipotalámicos (Figura 1.18).

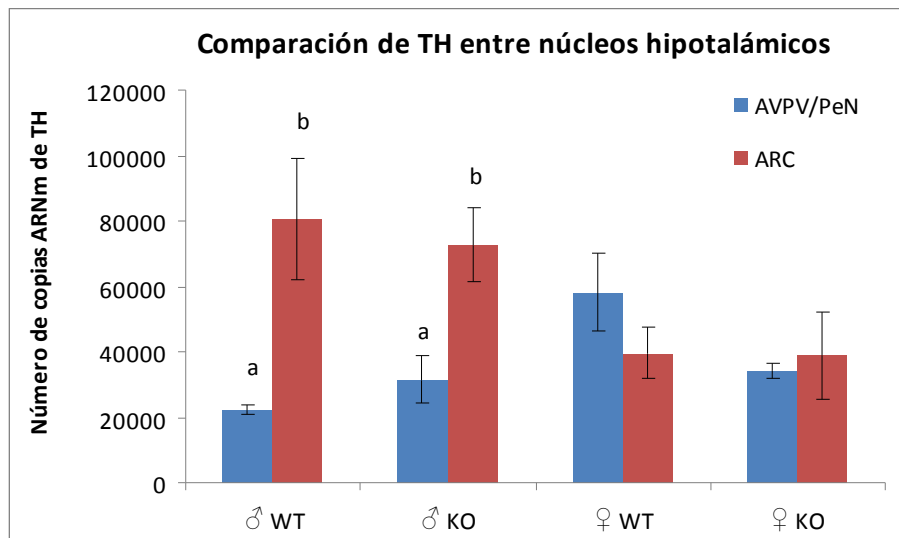


Figura 1.18: Número de copias del ARNm de *Th* (qPCR) en *micropunches* de AVPV/PeN y ARC de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. ANOVA en tres sentidos: interacción triple NS, interacción sexo x área $p < 0.01$; Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). N=4-7.

Estos resultados muestran que mientras la expresión de *Kiss1* en el AVPV/PeN no se altera por la falta del RGABA_B, la expresión de *Th*, sí lo hace, indicando que la ausencia de un RGABA_B funcional impacta a cada tipo neuronal de manera diferencial.

RESULTADOS I B. EJE GONADOTRÓFICO: ADENOHIPÓFISIS

Luego de analizar qué sucede en el hipotálamo por la falta de un RGABA_B funcional y de encontrar alteraciones principalmente a nivel de GnRH (síntesis y frecuencia de secreción), GABA (contenido y síntesis de la enzima GAD67), expresión de *Er1* y *Pgr*, sin encontrar diferencias en *Kiss1*, decidimos evaluar como esas alteraciones podrían estar impactando a nivel hipofisario. Además hay que tener en cuenta que los RGABA_B también se expresan en la hipófisis y por ende la falta del RGABA_B en los ratones GABA_{B1}KO podría estar teniendo un efecto *per sé* en dicha glándula.

En primer lugar medimos la expresión del receptor de GnRH (*Gnrh1r*) en HF, ya que el incremento en la frecuencia pulsátil de GnRH podría estar aumentando la expresión del receptor en la hipófisis, como se ha propuesto (Wildt *et al.* 1981; Bedecarrats & Kaiser 2003).

Encontramos que la expresión del ARNm de *Gnrh1r* depende del sexo y del genotipo (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$) (Figura 1.19). Existe una diferencia sexual en los animales WT, con mayor expresión en los machos con respecto a las hembras ($p < 0.001$), como fuera descrita previamente (Lacau-Mengido *et al.* 1998). Esta diferencia se pierde en los $GABA_{B1}KO$ y además, en las hembras $GABA_{B1}KO$, se encontró una mayor expresión de *Gnrh1r* con respecto a sus pares WT ($p < 0.05$).

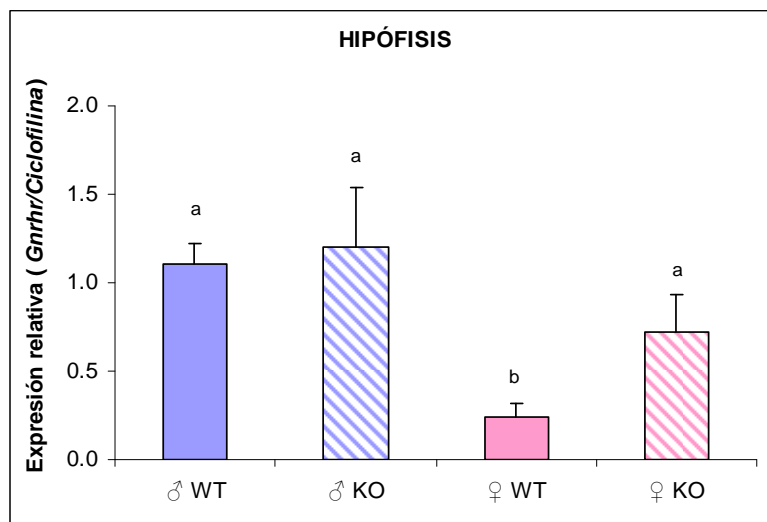


Figura 1.19: Expresión relativa de *Gnrh1r* (qPCR) en hipófisis de ratones adultos WT y $GABA_{B1}KO$. ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). N= 8-10.

Este resultado concuerda con el aumento de pulsatilidad encontrado en las hembras $GABA_{B1}KO$, dado que una mayor frecuencia de pulsatilidad de GnRH favorece la expresión de su receptor en la hipófisis (Wildt *et al.* 1981; Bedecarrats & Kaiser 2003).

EXPRESIÓN DE *LHB* EN ADENOHIPÓFISIS (QPCR)

Luego medimos la expresión de la subunidad β de LH (*Lhb*) en HF, otro parámetro que podría estar alterado con el aumento en la frecuencia pulsátil de GnRH.

Encontramos que la expresión de *Lhb* es sexualmente dimórfica, mayor en machos que en hembras ($p < 0.0001$). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en la expresión de *Gnrh1r*, no encontramos diferencias genotípicas en la expresión de *Lhb* (Figura 1.20). Esto probablemente se deba a que la expresión de *Gnrh1r* es más sensible que *Lhb* a los cambios en la pulsatilidad de GnRH.

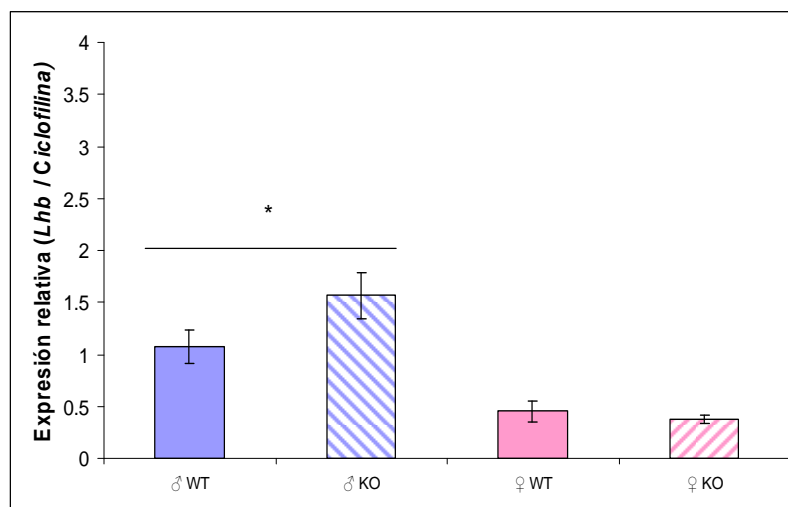


Figura 1.20: Expresión relativa de *Lhb* (qPCR) en hipófisis de ratones adultos WT y $GABA_{B1}$ KO. ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.0001$. N= 7-11.

CONTENIDO Y NIVELES SÉRICOS DE LH, FSH Y PRL (RIA)

Luego nos propusimos evaluar los niveles de las gonadotropinas, tanto su contenido hipofisario como sus niveles séricos, factores que también se ven influenciados por la frecuencia pulsátil de GnRH y que son críticos en la fisiología del eje gonadotrófico.

Tanto los contenidos hipofisarios como los niveles séricos de LH y FSH presentaron diferencias sexuales, con mayores niveles en machos que en hembras ($p < 0.001$), sin diferencias genotípicas (Figura 1.21).

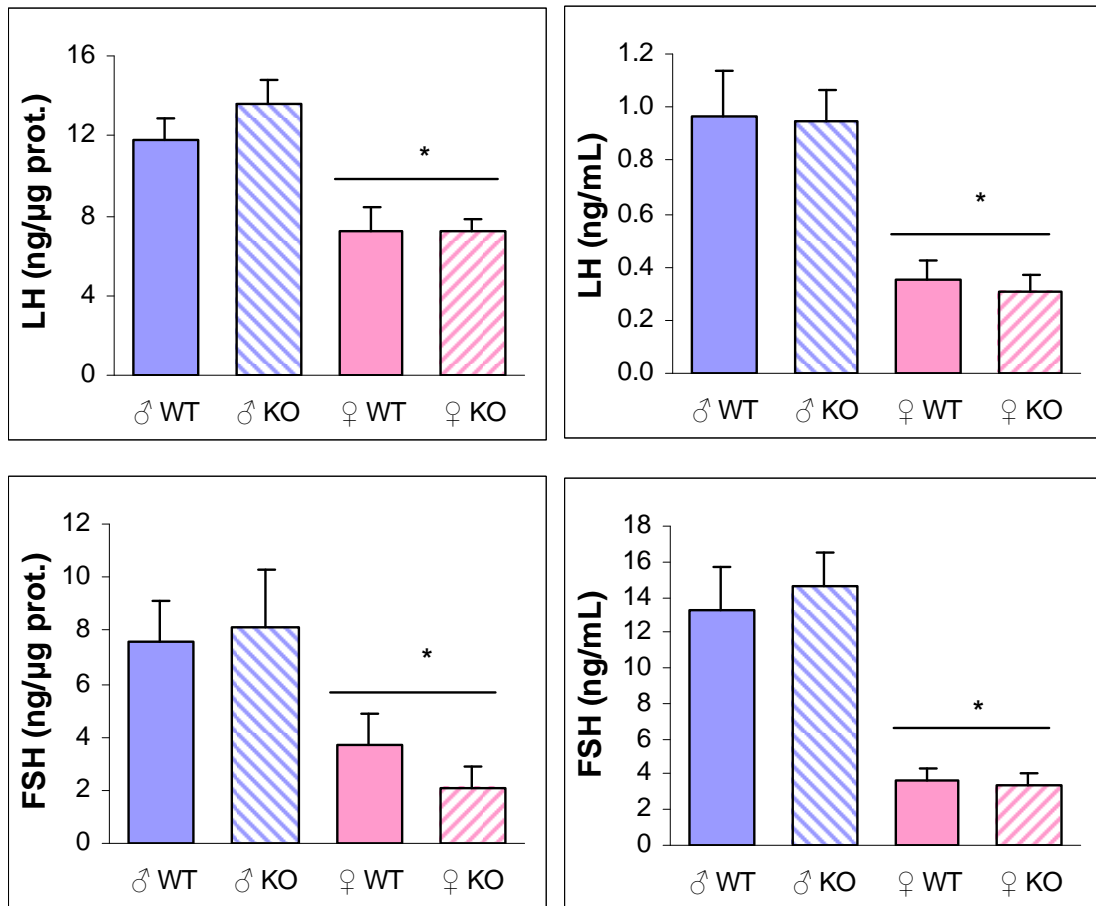


Figura 1.21: Contenido hipofisario (ng/μg proteínas, izquierda) y niveles séricos (ng/ml, derecha) de LH (arriba) y FSH (abajo) (RIA) en ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. ANOVA en dos sentidos para cada determinación: interacción NS, efecto principal sexo p<0.001. *: Contenido hipofisario y niveles séricos de LH y FSH en hembras distinto de machos. N (contenido LH y FSH)=8-13; N (LH sérico): 13-21; N=(FSH sérico):6-14.

Sin embargo, si bien las gonadotropinas no se vieron alteradas en las hembras GABA_{B1}KO no podemos descartar con estos resultados que exista una alteración en la secreción pulsátil de LH (no evaluada en este caso) en las hembras GABA_{B1}KO consecuencia del aumento de pulsatilidad de GnRH en estos animales.

Por otro lado, también evaluamos los niveles de prolactina sérica en ratones adultos por ser una hormona importante en la funcionalidad del eje gonadotrófico, en la formación del cuerpo lúteo y la cual se encuentra regulada positivamente por E₂ (Smith *et al.* 1975; Gonzalez *et al.* 2000). Además en resultados previos, habíamos observado que los machos GABA_{B1}KO presentaban una leve hiperprolactinemia basal (Catalano *et al.* 2005).

Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los grupos, aunque existe una tendencia hacia valores más altos de prolactina en las hembras con respecto a los machos, coincidente con bibliografía (Becu & Libertun 1982) y en los ratones GABA_{B1}KO con respecto a los WT (Figura 1.22).

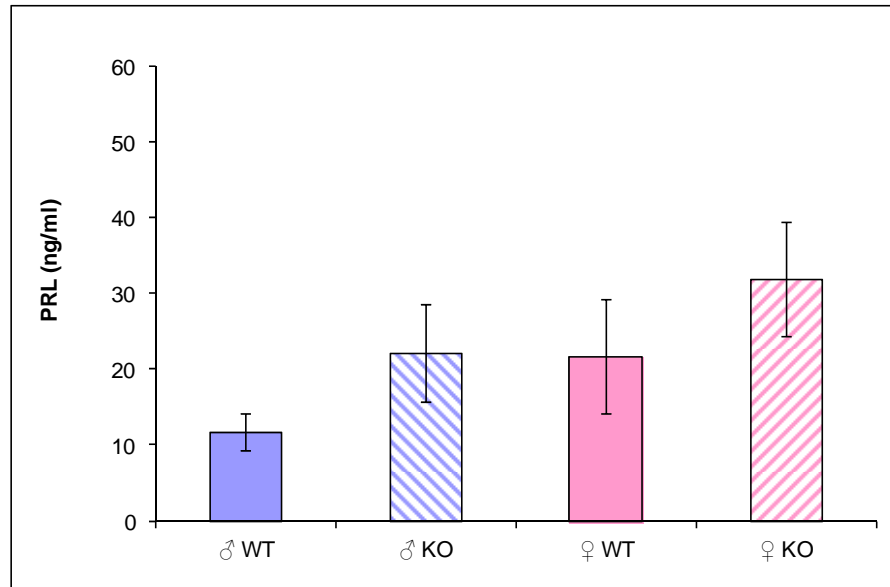


Figura 1.22: Niveles séricos (ng/ml) de prolactina (RIA) en ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. ANOVA en dos sentidos: NS. N=10-11.

RESULTADOS I C. EJE GONADOTRÓFICO: GÓNADAS

Finalmente evaluamos el último punto clave del eje reproductivo: las gónadas. De esta manera, trataremos de entender qué le sucede al eje en su totalidad y si la falta del RGABA_B afecta localmente estos tejidos en su función.

CONTENIDO Y NIVELES SÉRICOS DE ESTEROIDES GONADALES (RIA)

Dado que la expresión de *Kiss1* está altamente regulada por E₂ y que el GABA es uno de los principales mediadores en la regulación de la retroalimentación positiva y negativa de estradiol sobre las neuronas GnRH, quisimos evaluar cómo se encontraban los esteroides gonadales en los animales GABA_{B1}KO con respecto a los WT. Además evaluamos el peso de las gónadas y del útero, como marcadores de los niveles de esteroides.

El contenido total por ovario y los niveles séricos de estradiol no difieren entre las hembras de ambos genotipos (Figura 1.23 y 1.24). De la misma manera, el contenido testicular y los niveles séricos de testosterona no difieren entre los machos de ambos genotipos (Figura 1.23 y 1.24). Debemos aclarar que, dado que las hembras fueron sacrificadas en estro, no podemos descartar diferencias en el período pre-ovulatorio (proestro), clave para provocar la descarga pre-ovulatoria de LH.

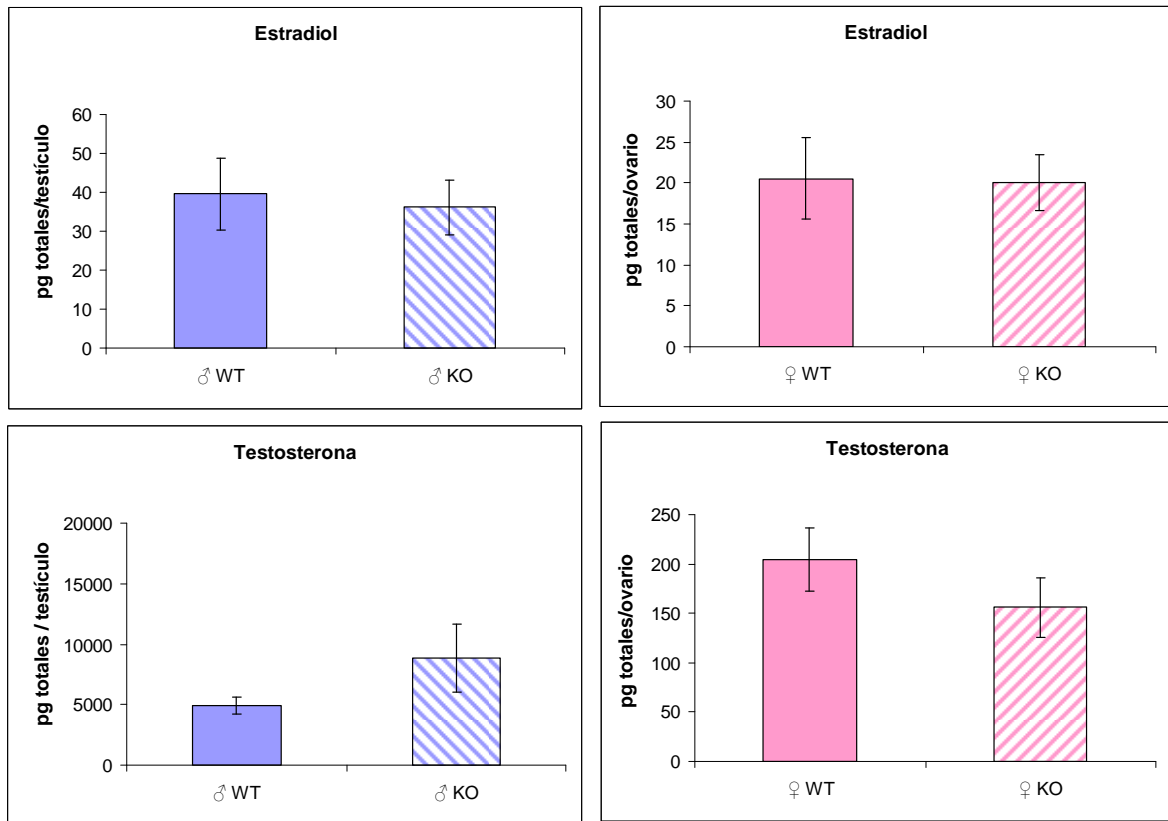


Figura 1.23: Contenido gonadal (pg totales/gónada) de estradiol (arriba) y testosterona (abajo) (RIA) en ratones adultos WT y $GABA_{B1}KO$. Test t para cada determinación: NS. N=5-8.

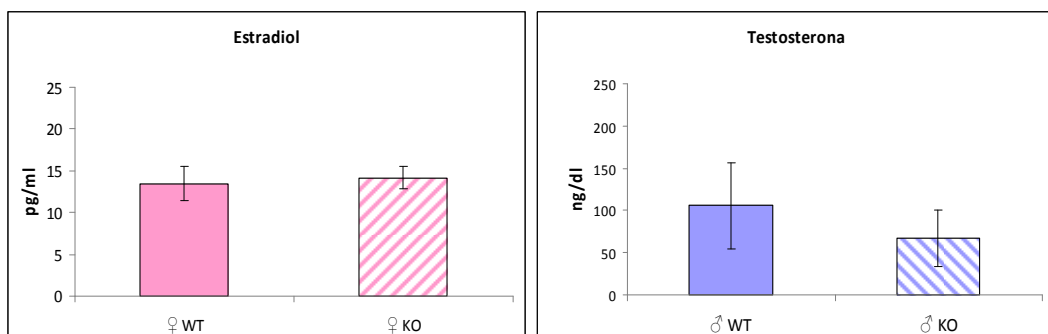


Figura 1.24: Niveles séricos de estradiol (pg/ml, ELISA, izquierda) y testosterona (ng/ml, RIA, derecha) en ratones adultos WT y $GABA_{B1}KO$. Test t para cada determinación: NS. N=5-8.

En base a estos resultados, descartamos la posibilidad que los cambios observados a nivel central en la expresión de los genes evaluados se deban a cambios en los niveles de estradiol o testosterona circulantes.

Por otro lado, dado que el cuerpo lúteo es el principal secretor de progesterona (P_4) y que las hembras $GABA_{B1}KO$ presentan alteraciones reproductivas y, como veremos más adelante, un porcentaje disminuido de ovulación, era posible que la P_4 sérica se encontrara disminuida en estos ratones. Para corroborar esta hipótesis, evaluamos los niveles séricos de P_4 en ratones adultos de ambos sexos y genotipos.

Al evaluar los niveles séricos de P_4 en machos y hembras (sacrificadas en el primer estro) adultos, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 1.25). Sin embargo, se observa una tendencia a ser mayor en machos que en hembras.

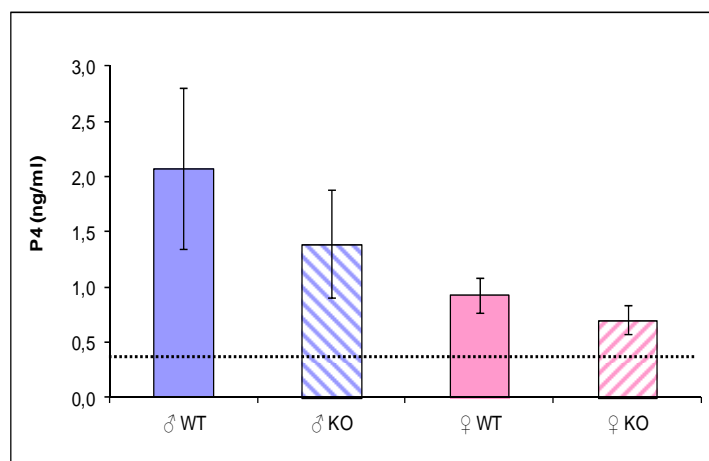


Figura 1.25: Niveles séricos de progesterona (ng/ml, RIA) en ratones adultos WT y $GABA_{B1}KO$ (hembras sacrificadas en primer estro, al igual que para recuento ovocitario). ANOVA en dos sentidos NS. N=8.

PESO DE GÓNADAS Y ÚTERO

Si bien las hembras $GABA_{B1}KO$ presentan un peso ligeramente pero significativamente menor que las WT (Hembras WT: 24.55 ± 0.74 gr; Hembras $GABA_{B1}KO$: 21.15 ± 0.60 gr. Test t $p < 0.01$. N=7-8.), no difieren ni en el peso de sus ovarios ni en el peso del útero (Figura 1.26). Tampoco se observan diferencias significativas si se refiere el peso del órgano al peso corporal (datos no mostrados). Los machos tampoco difieren entre genotipos en el peso corporal (Machos WT: 28.33 ± 2.81 gr; Machos $GABA_{B1}KO$: 25.33 ± 1.76 gr. Test t NS. N=6-9) ni en el peso testicular (Figura 1.27).

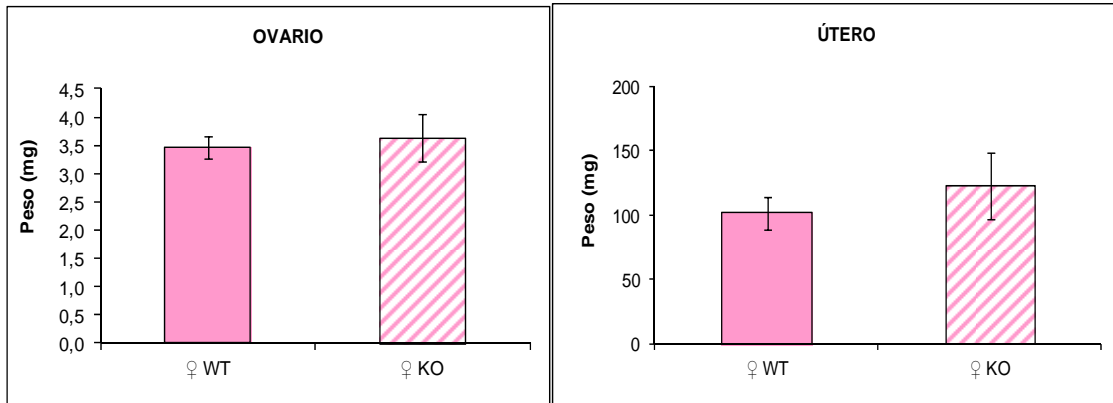


Figura 1.26: Peso (mg) del ovario (izquierda) y del útero (derecha) en hembras adultas WT y GABA_{B1}KO. Test t para cada determinación NS. N=7-8.

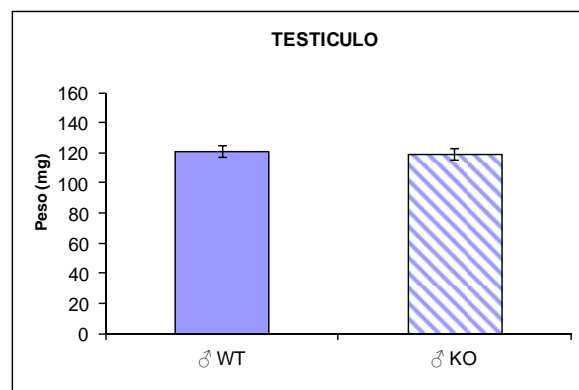


Figura 1.27: Peso (mg) del testículo en machos adultos WT y GABA_{B1}KO. Test t NS. N=6-9.

Estos resultados concuerdan con el contenido y niveles séricos de los esteroides gonadales similares entre los genotipos.

OVULACIÓN Y NÚMERO DE OVOCITOS OVULADOS

A pesar que los parámetros gonadales no se encuentran alterados en los animales GABA_{B1}KO en el momento evaluado, pero teniendo en cuenta los antecedentes previos que demostraban que las hembras presentan alteraciones en los ciclos estrales y en la fertilidad (Catalano *et al.* 2005), decidimos evaluar el porcentaje de ovulación y el número de ovocitos ovulados de hembras sacrificadas en el primer día de estro (E1).

El porcentaje de ovulación fue mucho menor en las hembras GABA_{B1}KO con respecto a las WT (WT: 78/ ; GABA_{B1}KO: 14/ , $p < 0.005$) (Figura 1.28). Sin embargo, en aquellas

hembras que ovularon, el número de ovocitos encontrados en el oviducto no fue distinto entre genotipos (Figura 1.29). A continuación se puede observar una microfotografía (4X) de una hembra WT donde se observan los ovocitos en oviducto, dentro de la ampulla (Figura 1.29).

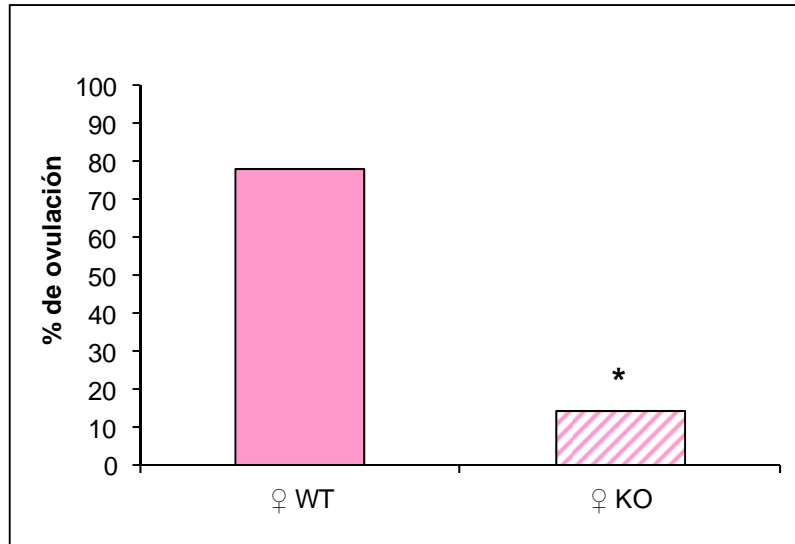


Figura 1.28: Porcentaje de ovulación en hembras adultas WT y GABA_{B1}KO (sacrificadas en primer día de estro). χ^2 p<0.005. *: Porcentaje de ovulación en hembras WT distinto de hembras GABA_{B1}KO. N=9-14.

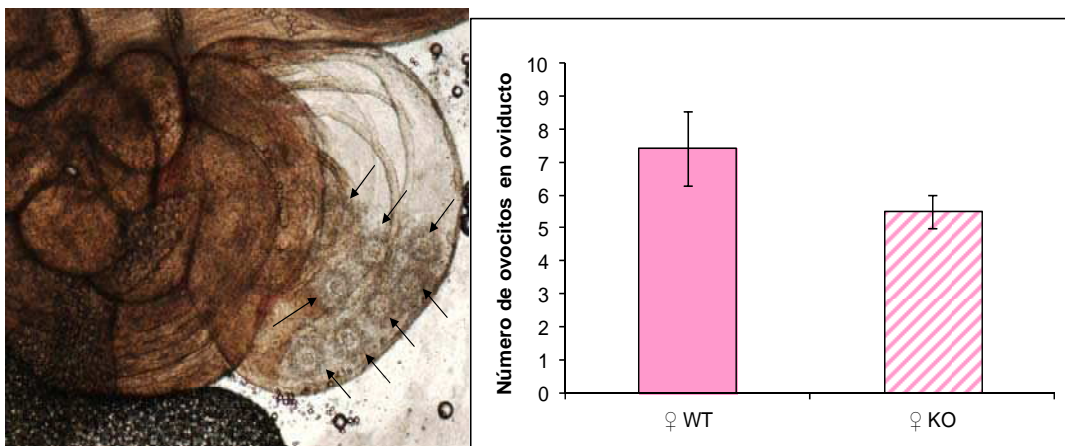


Figura 1.29: Microfotografía representativa (4X, izquierda) de una hembra WT. Flechas: ovocitos dentro de la ampulla. Número de ovocitos en oviducto (derecha) de hembras adultas WT y GABA_{B1}KO (sacrificadas en primer día de estro). Test t NS.

Además, dado que durante el primer estro se encuentra el segundo pico de FSH (que recluta la nueva cohorte folicular) quisimos evaluar los niveles séricos de dicha hormona en las hembras sacrificadas para evaluar ovulación.

Encontramos que las hembras $GABA_{B1}KO$ presentan una disminución con respecto a las WT en los niveles séricos de FSH en la mañana de E1 ($p < 0.001$) (Figura 1.30), en concordancia con el menor porcentaje de ovulación, a diferencia de los niveles de FSH sérico reportadas más arriba que provenían de hembras sacrificadas en estro sin diferenciar en primer o segundo estro del ciclo.

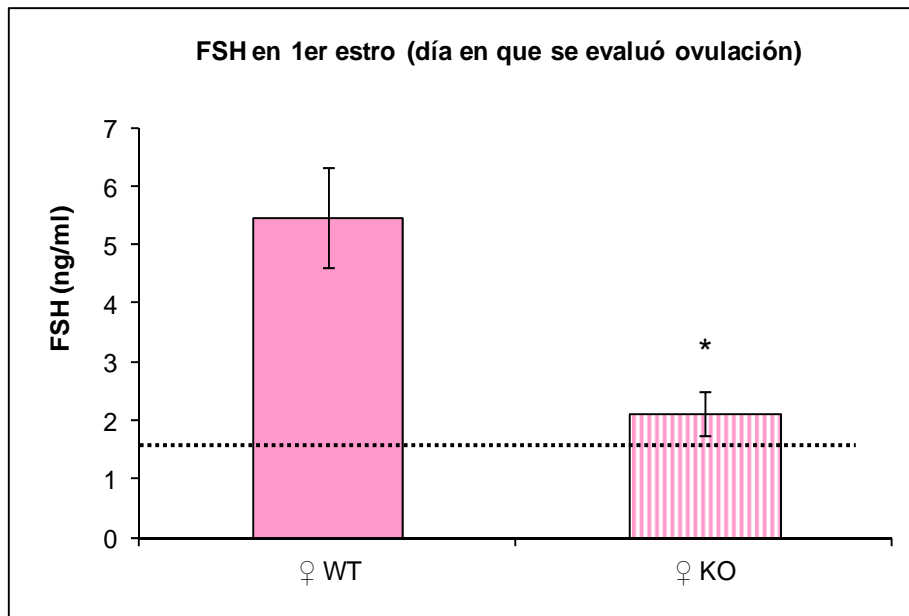


Figura 1.30: Niveles séricos de FSH (ng/ml) en hembras adultas WT y $GABA_{B1}KO$ (sacrificadas en primer día de estro). Test t $p < 0.001$. *: Niveles séricos de FSH en hembras WT distintos de hembras $GABA_{B1}KO$. N=10-13.

RECUESTO DE ESTRUCTURAS OVÁRICAS (HE)

Debido a la importante disminución en el porcentaje de ovulación y del segundo pico de FSH en las hembras $GABA_{B1}KO$, decidimos evaluar la estructura ovárica por tinción de hematoxilina-eosina y realizar un recuento folicular, de atresia y cuerpos lúteos en hembras de ambos genotipos.

En primer lugar, evaluamos el número de estructuras ováricas totales y no encontramos diferencias significativas entre los genotipos (Figura 1.31).

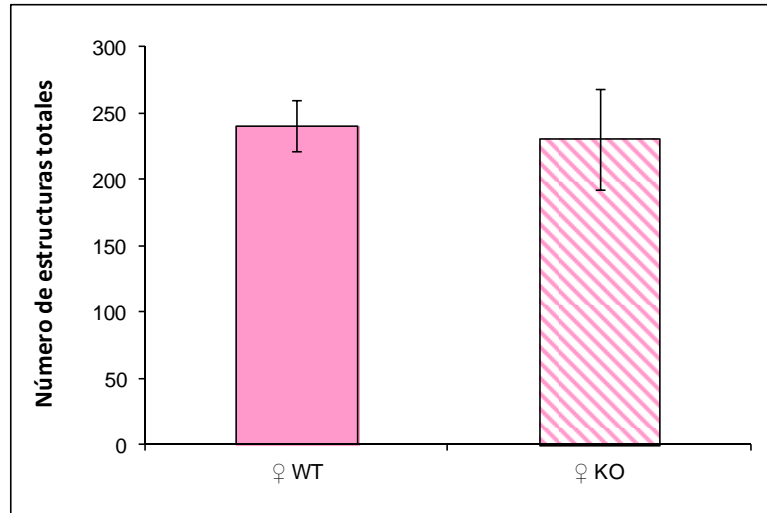


Figura 1.31: Número de estructuras ováricas totales en hembras WT y GABA_{B1}KO adultas. Test t NS. N=4.

Luego analizamos el número de folículos primordiales/primarios (FP), pre-antrales (FPA), antrales tempranos (FAT), pre-ovulatorios (FPO), atrésicos (FA) y cuerpos lúteos (CL). Tampoco encontramos diferencias significativas entre los genotipos en estos parámetros (Figura 1.32). Sin embargo, se observa una tendencia en las hembras GABA_{B1}KO a tener disminuido el porcentaje de CL (Test t: $p=0.13$), resultado que hubiésemos esperado, tomando en cuenta la disminución en el porcentaje de ovulación y del segundo pico de FSH. Cabe aclarar que en el recuento de CL se tomaron en cuenta tanto los CL recientes como aquellos en regresión y que el número de casos evaluados hasta el momento fue de cuatro hembras para cada genotipo. Por lo que sería interesante aumentar el N y diferenciar en que estadio de desarrollo se encuentran los CL y así poder evaluar si existe diferencia entre los genotipos.

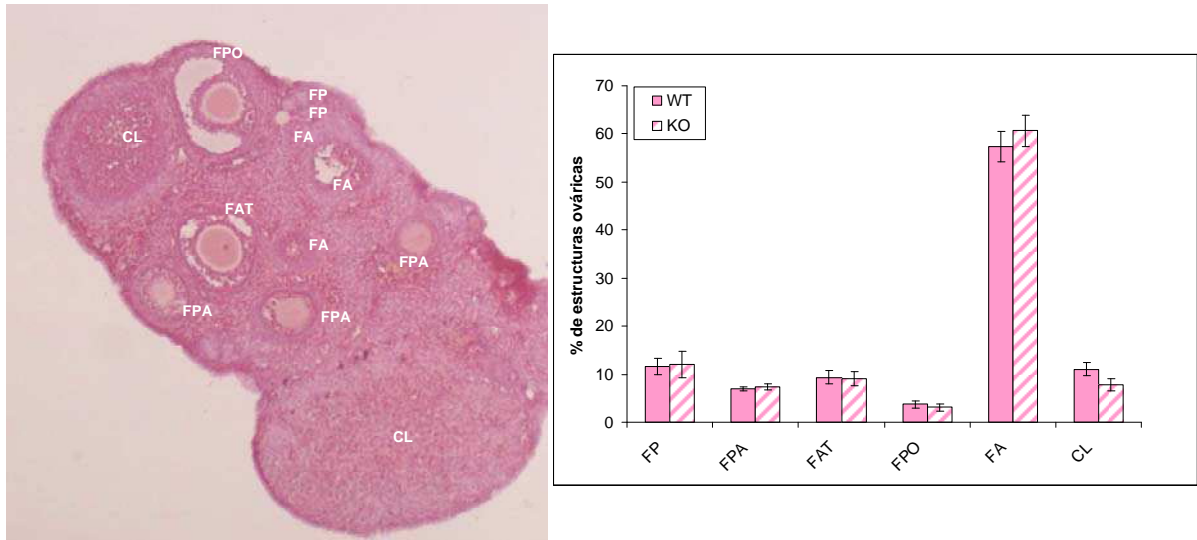


Figura 1.32: Izquierda: microfotografía representativa (10X) de un corte de ovario teñido con hematoxilina eosina en dónde se observan las distintas estructuras analizadas. Derecha: Porcentaje de estructuras ováricas en hembras WT y GABA_{B1}KO adultas: folículos primordiales/primarios (FP), pre-antrales (FPA), antrales tempranos (FAT), pre-ovulatorios (FPO), atrésicos (FA) y cuerpos lúteos (CL) Test t para cada estructura evaluada NS. N=4.

DISCUSIÓN I

En resultados previos de nuestro laboratorio demostramos alteraciones importantes en la ciclicidad, el aumento de LH post-castración y en los índices de reproducción de las hembras GABA_{B1}KO (Catalano *et al.* 2005). Estos resultados sugerirían que los RGABA_B participarían en la regulación de estas funciones, de acuerdo con experimentos farmacológicos (Lux-Lantos *et al.* 2008; Adler & Crowley 1986; Hartman *et al.* 1990; Akema & Kimura 1992). En este capítulo nos propusimos estudiar el rol de los RGABA_B en ratones adultos que carecen de RGABA_B funcional (GABA_{B1}KO) desde la concepción, evaluando la funcionalidad del eje gonadotrófico.

Demostramos que la falta del RGABA_B desde la concepción altera la expresión sexualmente dimórfica de genes críticos para la reproducción en hipotálamo anterior, tales como: *Gnrh1* y *Gad1*, mientras que la expresión de *Kiss1* no se modifica. Además la falta del RGABA_B también altera la fisiología de GnRH y otros parámetros de fertilidad, especialmente en las hembras GABA_{B1}KO (Figura 1.33). A continuación discutimos los resultados más salientes de este capítulo.

Co-localización *Kiss1*-RGABA_{B1} y expresión de *Kiss1* en AVPV/PeN y ARC

La posible interacción entre la señalización del RGABA_B y las neuronas *Kiss1* no se había estudiado hasta este momento. En este capítulo, quisimos evaluar si las alteraciones reproductivas de las hembras GABA_{B1}KO se debían a alteraciones en el sistema *Kiss1*.

Aunque la presencia de RGABA_A en las neuronas de *Kiss1* ha sido sugerida basada en manipulaciones farmacológicas en monos (Kurian *et al.* 2012), en este capítulo demostramos por primera vez que la subunidad GABA_{B1} del RGABA_B (RGABA_{B1}) se expresa en un alto porcentaje en las neuronas *Kiss1* de ratones adultos. Contrariamente a nuestra hipótesis, y a pesar de la alta co-localización de RGABA_{B1} en la mayoría de las neuronas *Kiss1*, encontramos que los niveles de *Kiss1* en AVPV/PeN y ARC, evaluados tanto por HIS como por qPCR, eran muy similares entre genotipos para cada sexo. Dados los antecedentes de subfertilidad y alteraciones en la pulsatilidad y expresión de GnRH en las hembras adultas GABA_{B1}KO (Catalano *et al.* 2005), esta falta de efecto sobre las neuronas *Kiss1* hipotalámicas fue inesperada. Basado en estos resultados, proponemos que las alteraciones reproductivas observadas en las hembras GABA_{B1}KO adultas no son debidas a alteraciones en la expresión de *Kiss1* en los principales núcleos hipotalámicos, AVPV/PeN y ARC, que controlan la fertilidad. Esto sugeriría que existirían otros circuitos reproductivos que podrían estar involucrados, como el GABAérgico, además de otros factores como glutamato, NPY, etc. Sin embargo, con estos resultados no podemos descartar la posibilidad que la secreción de kisspeptina esté alterada en ratones GABA_{B1}KO, dado que la expresión génica y la expresión de la proteína/péptido codificada no siempre correlacionan positivamente y que, además, sabemos que la frecuencia pulsátil de kisspeptina se corresponde con la de GnRH (Keen *et al.* 2008), ésta última aumentada en las hembras GABA_{B1}KO (Figura 1.33).

Expresión y pulsatilidad de GnRH

Las neuronas de GnRH se originan en el compartimento nasal, migran junto con los nervios olfatorios atravesando la placa cribiforme. Luego, la mayoría migran caudalmente hacia la base del cerebro para alcanzar su destino final en el hipotálamo, mientras que una sub-población permanece en la región olfatoria (Schwanzel-Fukuda

1999; Schwarting *et al.* 2004; Wierman *et al.* 2004; Tobet & Schwarting 2006). Los RGABA_B se expresan en las neuronas GnRH desde edades tempranas del desarrollo. Esto se demostró tanto en líneas celulares inmortalizadas de neuronas GnRH (Martinez *et al.* 1994; Tobet *et al.* 2001; Garyfallou *et al.* 2006), en neuronas GnRH embrionarias que expresan GFP (Fujioka *et al.* 2007), como así también en neuronas hipotalámicas *in situ* (Sliwowska *et al.* 2006). Además, se sabe que los RGABA_B controlan la migración y el posicionamiento celular dentro del VMN y en el APO-HA (Wolfe *et al.* 2005) en ratones, mientras que estudios farmacológicos indicarían que no participan en la migración de las neuronas de GnRH, como sí lo hacen los RGABA_A (Heger *et al.* 2003; Lee *et al.* 2008a; Wierman *et al.* 2011). Por otro lado, los RGABA_B también modulan la proliferación celular y diferenciación de progenitores neuronales (Fukui *et al.* 2008).

En este capítulo demostramos patrones de expresión de GnRH en las distintas áreas analizadas en los ratones adultos GABA_{B1}KO diferentes a los hallados en los WT y su correlato funcional, la liberación pulsátil de dicha neurohormona.

En cuanto a la expresión de *Gnrh1* en HA encontramos una diferencia sexual en ratones WT, cuatro veces mayor en machos con respecto a hembras, la cual se invertía en los ratones GABA_{B1}KO. Estos resultados indicarían que la ausencia de un RGABA_B funcional altera la diferenciación sexual de esta área típicamente dimórfica, la cual determina la actividad cíclica en las hembras (Freeman 1986). Esto concuerda con las observaciones de Wolfe y col. que demuestran la participación de los RGABA_B en inducir la localización sexualmente dimórfica de las poblaciones neuronales en el APO-HA (Wolfe *et al.* 2005). Nuestros resultados sobre la expresión de *Gnrh1* en adultos difieren de aquellos obtenidos por Gore y col. (Gore *et al.* 1999), dado que en ese trabajo se reportan niveles mayores en las hembras con respecto a los machos. La discrepancia entre estos resultados podría deberse a los núcleos incluidos en el HA, las distintas cepas utilizadas o los métodos de detección empleados.

Con respecto a los resultados obtenidos para la expresión de *Gnrh1* en HMB, encontramos una diferencia sexual (GnRH en hembras mayor que en machos) y, además, la expresión de *Gnrh1* estaba significativamente aumentada en ratones GABA_{B1}KO de ambos sexos. Por lo tanto, en esta región hipotalámica, la falta del

RGABA_B provocó una alteración a nivel de la expresión de *Gnrh1*, pero sin afectar el dimorfismo sexual presente en los ratones WT, a diferencia de lo observado en HA.

En el capítulo III evaluaremos si estas diferencias en la expresión de *Gnrh1* son debidas a alteraciones en el proceso migratorio de estas neuronas, afectando el número y la localización de las mismas.

Por otro lado, cabe mencionar que los resultados obtenidos para la expresión de *Gnrh1* mediante HIS en APO no presentaron diferencias entre los grupos, a diferencia de lo encontrado en HA (conteniendo el APO) mediante qPCR. Estas diferencias podrían deberse a la diferente sensibilidad entre las técnicas y/o a las distintas áreas evaluadas en cada caso, dado que el HA es un área más abarcativa. Además, también es importante destacar que las alteraciones encontradas en la expresión de *Gnrh1* no responden a alteraciones hipotalámicas de *Kiss1*, dado que como vimos anteriormente, tanto la expresión de *Kiss1* en el AVPV/PeN como en el ARC no se encuentra afectada por la falta del RGABA_B.

Por otro lado, la expresión de *Gnrh1* en BO y en corteza fue similar entre sexos y genotipos. Aunque las neuronas de GnRH presentes en el BO comparten el mismo origen embriológico que las hipotalámicas, ni éstas ni las de corteza muestran el mismo patrón sexual dimórfico de expresión, típico del HA.

Estos resultados demostrarían que la falta de un RGABA_B funcional impacta en la síntesis de GnRH de manera área-específica y la alteración más importante encontrada fue la inversión de la expresión sexual dimórfica de *Gnrh1* en el HA y el aumento marcado en la expresión de *Gnrh1* en ambos sexos en HMB. El aumento de la expresión *Gnrh1* en HA y HMB en las hembras GABA_{B1}KO podría estar causando las alteraciones reproductivas encontradas previamente (Figura 1.33).

Si bien la expresión génica de *Gnrh1* estaba alterada, para analizar cómo se encontraba la fisiología de GnRH en los ratones GABA_{B1}KO, evaluamos la liberación pulsátil de GnRH a partir de explantos hipotalámicos. Las hembras GABA_{B1}KO (sacrificadas en estro) mostraron un aumento en la frecuencia de liberación del péptido, como se describió previamente en ratones que sobre-expresan *Gad1* en las neuronas GnRH (Heger *et al.* 2003). Este aumento en la pulsatilidad de GnRH podría

ser consecuencia del aumento de la expresión hipotalámica de *Gnrh1* observada en las hembras GABA_{B1}KO (Figura 1.33), como fue descrito arriba. Además, este aumento en la pulsatilidad podría estar relacionado con los desórdenes reproductivos observados en las hembras GABA_{B1}KO (Catalano *et al.* 2005). Se han descrito aumentos en la pulsatilidad de GnRH en pacientes con síndrome de poliquistosis ovárico (Marshall & Eagleson 1999) y en modelos experimentales de esta patología (Fernandez *et al.* 2009), en la cual la persistencia en estro es también característica.

Por otro lado, también evaluamos la respuesta hipotalámica de hembras WT y GABA_{B1}KO (ovariectomizadas con reemplazo hormonal) a la estimulación con Kiss-10 y su antagonista Kiss-234. Encontramos, de manera sorprendente, que los hipotálamos de las hembras GABA_{B1}KO responden a Kiss-10 aumentando la amplitud del pico de GnRH y la masa secretada por pulso en comparación con las hembras WT tratadas con el agonista. Se sabe que la kisspeptina que se libera en la EM es pulsátil y correlaciona con los pulsos de GnRH (Keen *et al.* 2008). Por otro lado, también se sabe que la administración pulsátil de kisspeptina gobierna la secreción gonadotrófica en monos machos juveniles que fueran previamente tratados con GnRH. Sin embargo, la administración continua de kisspeptina inhibe la secreción gonadotrófica luego de un efecto estimulador agudo, probablemente debido a la desensibilización del receptor (Tovar *et al.* 2006; Plant *et al.* 2006; Seminara *et al.* 2006). En nuestro caso, encontramos que los hipotálamos WT incubados en forma constante con Kiss-10 disminuyen la amplitud y la masa secretada por pulso con respecto al control, como es de esperar, probablemente causada por una desensibilización del receptor. Sin embargo, no sucede lo mismo en los hipotálamos GABA_{B1}KO, los cuales tienden a aumentar la amplitud y la masa secretada por pulso con respecto a su control. Nuestros resultados en los animales WT coinciden con los recientemente publicados, en donde se ha descrito que la administración continua de Kiss-10 durante 6hs (2.5 nM) a cultivos hipotalámicos (APO) es menos efectiva en inducir la secreción pulsátil de GnRH en comparación con una administración pulsátil de Kiss-10 (Choe *et al.* 2013). Por lo tanto, postulamos que las hembras GABA_{B1}KO tendrían alguna alteración a nivel del *Kiss1r*, tanto en su expresión, desensibilización y/o señalización, que justificarían los resultados obtenidos en la incubación hipotalámica *in vitro*.

Estos resultados demuestran que, si bien la expresión de *Kiss1* en AVPV-PeN y ARC no está alterada en los ratones GABA_{B1}KO, la sensibilidad hipotalámica a este péptido sí lo está. Esto podría contribuir al aumento en la pulsatilidad de GnRH observada en las hembras GABA_{B1}KO sin tratamiento y jugar un rol importante en la fisiología del eje reproductivo de estos animales.

Expresión de *Gad1* y contenido de neurotransmisores

La pulsatilidad de GnRH es, en parte, intrínseca de las neuronas GnRH (Terasawa 1995; Dellovade *et al.* 1998), influenciada por kisspeptina (Plant & Ramaswamy 2009), pero también está influenciada por varios neurotransmisores (Stojilkovic *et al.* 1994; Terasawa 1995).

En este capítulo investigamos algunos de los neurotransmisores más relevantes en la regulación de GnRH, tales como el GABA (Martinez *et al.* 1994; Clarkson & Herbison 2006a; Christian & Moenter 2007; Martin *et al.* 2007; Grove-Strawser *et al.* 2007) y glutamato, el precursor de la biosíntesis de GABA (Mahesh & Brann 2005; Clarkson & Herbison 2006a). Además, medimos taurina como neurotransmisor control, aunque algunos efectos de este neurotransmisor sobre GnRH también han sido demostrados (Arias *et al.* 1995; Feleder *et al.* 1999) y también puede actuar como un agonista de los RGABA_A y RGABA_B (del Olmo *et al.* 2000; Behar *et al.* 2001; Belluzzi *et al.* 2004). Los RGABA_B están presentes tanto en las neuronas GABAérgicas como en las glutamatérgicas. En las neuronas GABA son autoreceptores que se expresan en la pre- y post-sinapsis, los primeros modulando la liberación de neurotransmisores y los otros mediando la inhibición post-sináptica. En las neuronas glutamatérgicas los RGABA_B funcionan como heteroreceptores en los sitios pre- y post-sinápticos, modulando la liberación y los efectos del glutamato.

En los ratones adultos WT, GABA, glutamato y taurina mostraron patrones sexualmente dimórficos en el hipotálamo, los machos presentaron mayores niveles que las hembras, como fue descrito previamente para GABA (Grattan & Selmanoff 1997; Searles *et al.* 2000). De manera interesante, esta diferencia sexual en GABA y glutamato se pierde en los ratones GABA_{B1}KO. Además, las hembras GABA_{B1}KO presentaron un incremento de los niveles de estos neurotransmisores con respecto a las hembras WT (Figura 1.33).

Por otro lado, al evaluar la expresión de *Gad1*, enzima que cataliza la conversión de glutamato en GABA, encontramos que presentaba una clara diferencia sexual en HA de ratones WT, como fue descrito previamente en otras áreas cerebrales (Searles *et al.* 2000). Esta diferencia sexual también se pierde y se invierte en los ratones GABA_{B1}KO, idéntico a lo observado en la expresión de *Gnrh1* en el HA. Se ha reportado que la expresión sexual dimórfica de *Gad1* y también de los niveles de GABA en el periodo neonatal es crucial para el desarrollo de las características reproductivas sexualmente dimórficas que garantizan el éxito reproductivo en la adultez (Schwarz & McCarthy 2008a). Se sabe, además, que los niveles de glutamato neonatales son decisivos para el proceso de defeminización en el macho (Schwarz & McCarthy 2008b). En el capítulo III de esta tesis, estudiaremos si estas alteraciones en la expresión de *Gad1* y de neurotransmisores están también presentes en etapas neonatales.

Por otro lado demostramos que la expresión de *Gad1* y *Gnrh1* presentan correlación positiva únicamente en el HA, lo que llevaría a pensar que un aumento en *Gad1*, y por ende del contenido de GABA, en las hembras GABA_{B1}KO alteraría la expresión de *Gnrh1* en HA (Figura 1.33), como fue previamente descrito (Kang *et al.* 1995; Lee *et al.* 2008b). Además, cabe destacar que el aumento en el contenido de GABA y glutamato no necesariamente significa un aumento en la liberación de estos neurotransmisores. Sin embargo, estos resultados demuestran que la falta del RGABA_B funcional afecta profundamente la diferenciación sexual del HA, un efecto atribuido previa y principalmente a los RGABA_A (McCarthy *et al.* 2002).

Nuestros resultados sugieren que la participación de los RGABA_B en la determinación de la expresión sexual dimórfica de ciertos genes de manera área-específica está de acuerdo con trabajos que demuestran que los RGABA_B controlan la migración y el posicionamiento celular dentro del APO-HA (Wolfe *et al.* 2005) y del núcleo ventromedial del hipotálamo (McClellan *et al.* 2008), otro núcleo sexualmente dimórfico. Este patrón de GABA, glutamato y *Gad1*, varía con el sexo y el genotipo y a su vez es específico de HA, dado que no se observa ni en HMB ni en corteza.

Ambos neurotransmisores, GABA y glutamato, están intrínsecamente relacionados con la secreción de GnRH (Richter & Terasawa 2001; Ojeda *et al.* 2003; Clarkson & Herbison 2006a). La secreción de GnRH se piensa que, en mayor medida, es el

resultado del balance entre la regulación de GABA y glutamato (Petersen *et al.* 2003). Aunque se sabe que GABA inhibe GnRH y las gonadotropinas, ultimamente, se ha propuesto mediante trabajos electrofisiológicos que el efecto directo de GABA sobre las neuronas decapeptidérgicas sería estimuladorio, inclusive en la adultez (Heger *et al.* 2003; Moenter & DeFazio 2005). Entonces, el aumento en la pulsatilidad de GnRH observada en las hembras GABA_{B1}KO podría reflejar el aumento en GABA y glutamato en el hipotálamo. De manera interesante, Heger y col. han demostrado que la sobreexpresión de *Gad1* en las neuronas de GnRH, la cual aumentaba los niveles de GABA hipotalámicos, también incrementaron la pulsatilidad en las hembras jóvenes y además alteró la ciclicidad y fertilidad, similar a lo que hemos descrito en las hembras GABA_{B1}KO (Figura 1.33) (Catalano *et al.* 2005).

Otros reguladores importantes del dimorfismo sexual y la regulación del eje gonadotrófico son los esteroides gonadales. Testosterona, a través de su aromatización a estradiol, es fundamental en la determinación de las diferencias sexuales en el cerebro en desarrollo. El GABA, actuando a través de sus RGABA_A y RGABA_B, es una de las moléculas consideradas como principal efector de la acción hormonal de T (Tobet *et al.* 2009). Además, el GABA es uno de los mediadores clave en la regulación de la retroalimentación positiva y negativa de los estrógenos sobre las neuronas GnRH en las hembras (Moenter *et al.* 2009). Aunque no encontramos modificados la expresión hipotalámica de aromatasa (*Cyp19a1*), el contenido gonadal o los niveles séricos de T, E₂ o P₄ en los ratones GABA_{B1}KO, la expresión del *Er1*, tanto en HA como en HMB, se encontró aumentada en estos ratones. Por lo tanto, esto podría indicar que las neuronas hipotalámicas de los ratones GABA_{B1}KO tengan una mayor sensibilidad a los estrógenos, lo cual podría estar estableciendo las diferencias en la expresión de *Gnrh1* y *Gad1* y en los contenidos de GABA y glutamato.

Por otro lado, también evaluamos la expresión de *Pgr*, como marcador de los niveles de estradiol. El *Pgr* se expresa en regiones que tienen una función neuroendocrina importante en la reproducción, como el AVPV, el núcleo medio preóptico, el ARC y el núcleo ventromedial del hipotálamo (Wagner 2008), además de otras regiones. Se sabe que la expresión de este gen depende de los RE α y que existe una diferencia sexual (machos mayor que hembras) en el núcleo ARC y AVPV en ratas neonatas (Quadros *et al.* 2002b) y hasta el día 28 post-natal (Quadros *et al.* 2002a). También se

observó esta diferencia sexual en HT de ratas adultas (Guerra-Araiza *et al.* 2002). Prácticamente no hay bibliografía describiendo los niveles de expresión de *Pgr* en el HT de ratones.

En el AVPV/PeN, encontramos una diferencia sexual en los ratones WT (machos mayor que hembras) que se perdía en los GABA_{B1}KO debido a un incremento en la expresión de *Pgr* en las hembras GABA_{B1}KO con respecto a las WT. En el ARC, tanto los machos como las hembras GABA_{B1}KO presentaron una disminución en la expresión de *Pgr* con respecto a los WT, sin diferencias sexuales.

El aumento en la expresión de *Pgr* en el AVPV/PeN de hembras GABA_{B1}KO estaría de acuerdo con el aumento de la expresión de *Er1* demostrada en HA de estos mismo animales y con la bibliografía, en la cual se menciona un aumento en la expresión de *Pgr* dependiente de la expresión de *Er1* en hembras pero no en machos (Schwarz *et al.* 2010; Lauber *et al.* 1991). Es llamativa la disminución de *Pgr* en el ARC de ratones GABA_{B1}KO de ambos sexos y parecería ser un efecto independiente de los receptores de estrógeno alfa.

Expresión de otro gen sexualmente dimórfico: tiroxina hidroxilasa (*Th*)

Para evaluar si la falta del RGABA_B afecta la expresión en particular de ciertos genes, como *Gnrh1* y *Gad1*, o si también afecta la expresión de otros genes sexualmente dimórficos, decidimos evaluar en este capítulo la expresión de *Th*, enzima limitante en la síntesis de dopamina (Jaber *et al.* 1999; Jones *et al.* 1999).

El dimorfismo sexual (hembras mayor que machos) de *Th* en AVPV/PeN observado en nuestros resultados y previamente descrito por otros autores (Simerly *et al.* 1985; Simerly 1989; Semaan *et al.* 2010) se perdió en los ratones GABA_{B1}KO, principalmente debido a una disminución en la expresión de *Th* en las hembras GABA_{B1}KO con respecto a las WT. Se sabe que la expresión de *Th* depende de los niveles perinatales de esteroides gonadales y que los niveles circulantes de esteroides en las ratas adultas disminuyen la expresión de *Th* en esta región (Simerly 1989). Sin embargo, nosotros demostramos que los niveles de E₂ y T no se encontraban alterados en los ratones GABA_{B1}KO con respecto a los WT, pero sí encontramos que la sensibilidad a los estrógenos podría estar aumentada debido a un aumento en la expresión hipotalámica

de *Er1* en ambos sexos, lo que podría estar justificando, en parte, la disminución de la expresión de *Th* en las hembras GABA_{B1}KO.

Por otro lado, no encontramos cambios genotípicos en el núcleo ARC, únicamente demostramos una diferencia sexual (machos mayor que hembras). Estos resultados difieren de los encontrados en ratas, en donde no se observaron diferencias sexuales en el número de neuronas TH-positivas {Brawer, 1986 3948 /id} entre sexos, aunque las discrepancias pueden deberse a las distintas técnicas y modelos utilizados.

Estos resultados, nuevamente demuestran, al igual que *Gnrh1* y *Gad1*, una alteración del dimorfismo sexual de la expresión de un gen en HA. Por lo que creemos que esta región hipotalámica presenta una regulación importante mediada por los RGABA_B a esta edad y que la regulación a nivel del HMB no es tan crítica en el animal adulto.

Fisiología hipofisaria

Como se describió arriba, la pulsatilidad de GnRH se encontró incrementada en hembras GABA_{B1}KO (Figura 1.33) y la frecuencia de pulsatilidad es crítica para la fisiología hipofisaria (Wildt *et al.* 1981; Bedecarrats & Kaiser 2003). En primer lugar evaluamos la expresión del receptor de GnRH (*Gnrh1r*), el cual presentaba una diferencia sexual en ratones WT (machos mayor a hembras). Esta diferencia sexual en los niveles de expresión del receptor de GnRH ya había sido descrita en ratas de 30 días de edad (Lacau-Mengido *et al.* 1998). Sin embargo, los ratones GABA_{B1}KO perdían esa diferencia sexual y las hembras GABA_{B1}KO mostraron mayores niveles de expresión con respecto a las hembras WT, coincidiendo con el aumento de pulsatilidad de GnRH.

Luego analizamos los niveles hipofisarios y séricos de LH, FSH y PRL y ninguno de ellos se encontró alterado debido al genotipo. Sin embargo, no se puede descartar que exista una alteración a nivel de la pulsatilidad de secreción de LH en las hembras GABA_{B1}KO. Por otro lado, en resultados previos con cultivos celulares de adenohipófisis, donde nos independizamos de la regulación gonadal y del cerebro, demostramos que las hembras GABA_{B1}KO presentaban un aumento en la secreción basal de gonadotrofinas y una respuesta alterada a GnRH (Catalano *et al.* 2010). Además, también sabemos que la activación de RGABA_B inhibe la secreción de gonadotrofinas actuando directamente en las células hipofisarias, bloqueando los

canales de calcio voltaje-dependientes (Lux-Lantos *et al.* 2001). Todavía queda por determinar si la alteración en los gonadotropos *in vitro* es consecuencia de la falta local del RGABA_B o es también consecuencia del aumento en la pulsatilidad *in vivo* de GnRH, previo a la puesta *in vitro* de las células. De todas maneras, las diferencias observadas *in vitro* pueden verse enmascaradas en el animal entero con todos sus circuitos regulatorios intactos.

Parámetros gonadales

Aunque los niveles gonadales y séricos de las hormonas sexuales, E₂, T y P₄, no se vieron afectados debido al genotipo, encontramos que las hembras GABA_{B1}KO sacrificadas en la mañana del primer día de estro (E1) presentaban disminuido el porcentaje de ovulación, sin diferencias en el número de ovocitos ovulados, y esto era coincidente con la disminución de los niveles séricos de FSH en ese momento (segundo pico de FSH). Este segundo pico de FSH es sumamente importante para reclutar la nueva cohorte folicular para el siguiente ciclo (Hoak & Schwartz 1980). Estos resultados, claramente apuntan a que esta disminución en el porcentaje de ovulación sea el origen de los bajos índices de fertilidad en estas hembras. A pesar que no se encontraron diferencias en el número total de estructuras ováricas o en el porcentaje de folículos sanos, atrésicos o cuerpos lúteos (aunque estos presentaron una tendencia a disminuir en las hembras GABA_{B1}KO), no descartamos que lo que se encuentre afectado sea el número y estadio de desarrollo del cuerpo lúteo y proponemos diferenciar entre aquellos en regresión de los recientemente formados y aumentar el número de casos para avalar los resultados obtenidos de ovulación.

Es conocido, además, que el oviducto presenta RGABA_B y que éstos estarían involucrados en la contracción del tejido (Erdo *et al.* 1984). Por lo tanto, la falta de ovocitos en la ampulla también podría ser consecuencia de un impedimento en el pasaje por el oviducto.

CONCLUSIÓN I

Como conclusión de este capítulo, los resultados demuestran que la ausencia del $RGABA_B$ altera los patrones de expresión sexualmente dimórficos de genes críticos de la reproducción, como *Gnrh1*, *Gad1*, *Pgr* y *Th* en áreas clave del cerebro, importantes para una normal función reproductiva, como el HA (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: resumen de los resultados obtenidos para la expresión hipotalámica (HA: hipotálamo anterior y HMB: hipotálamo medio basal) de genes clave en la reproducción en ratones adultos.

Genes	HA		HMB	
	WT	KO	WT	KO
<i>Kiss1</i>	♂ < ♀	♂ < ♀	♂ = ♀	♂ = ♀
<i>Gnrh1</i>	♂ > ♀	♂ < ♀	♂ < ♀	♂ < ♀
<i>Gad1</i>	♂ > ♀	♂ < ♀	♂ = ♀	♂ = ♀
<i>Pgr1</i>	♂ > ♀	♂ = ♀	♂ = ♀	♂ = ♀
<i>Th</i>	♂ < ♀	♂ = ♀	♂ > ♀	♂ > ♀

Además, la falta del $RGABA_B$ afecta profundamente la fisiología de GnRH, especialmente en las hembras (Figura 1.33). Las hembras $GABA_{B1}KO$ presentan aumento en la pulsatilidad de GnRH, modificación en la sensibilidad hipotalámica a kisspeptina, aumento en la expresión de *Er1*, aumento en los contenidos de GABA y glutamato, así como también una disminución en el porcentaje de ovulación y en el segundo pico de FSH. Estas alteraciones en su conjunto darían lugar a la disrupción reproductiva observada. Sin embargo, estos cambios no son debidos a alteraciones a nivel de la expresión de *Kiss1* en el hipotálamo ni a los niveles de esteroides circulantes (Figura 1.33).

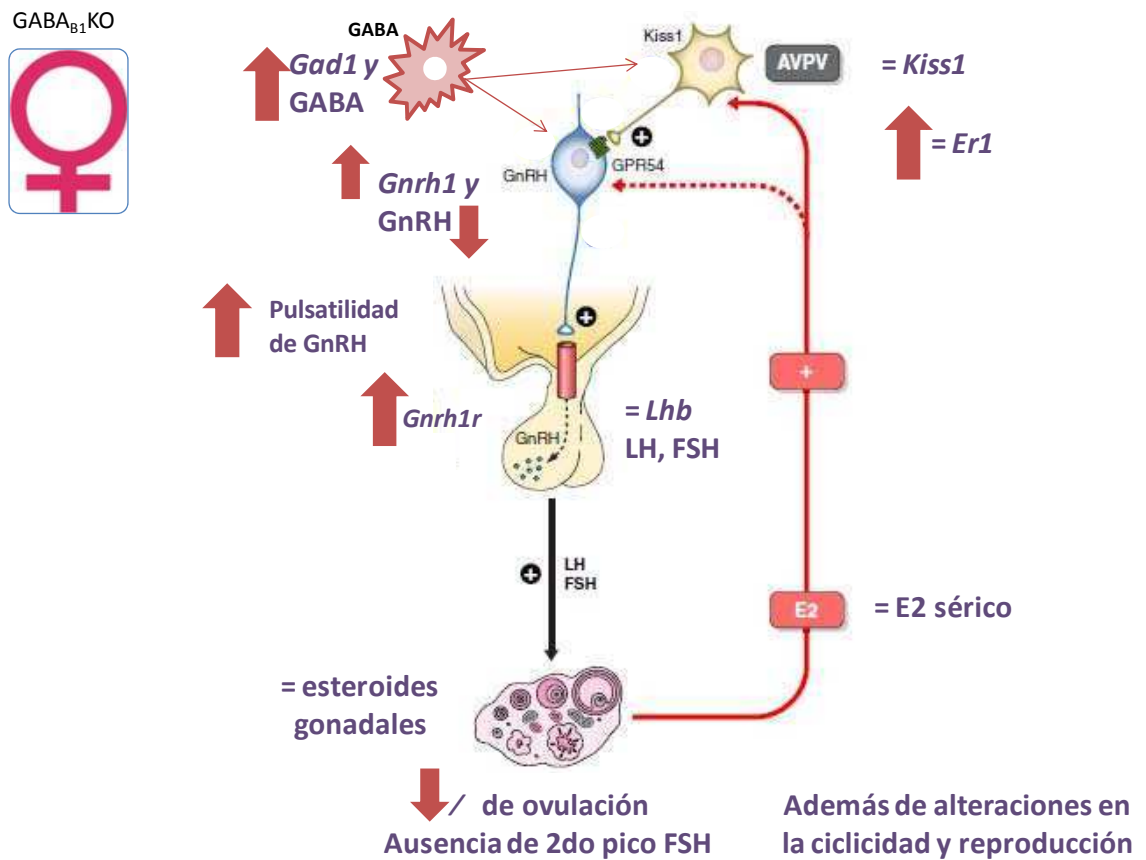


Figura 1.33: Esquema de los principales resultados obtenidos en las hembras $GABA_{B1}KO$ adultas en comparación con sus controles WT a lo largo del eje gonadotrófico.

Nuestra hipótesis es que la falta de $RGABA_B$ altera principalmente el sistema GABAérgico y éste, a su vez, altera la síntesis y secreción de $GnRH$, si bien no podemos descartar que sean disrupciones paralelas por la falta de expresión del $RGABA_B$ en ambos tipos neuronales. Todos estos parámetros contribuyen a la disrupción de los ciclos estrales y a las alteraciones en la fertilidad previamente observadas en estas hembras.

INTRODUCCIÓN II

Como vimos, en roedores, *Kiss1* se sintetiza principalmente en dos núcleos del hipotálamo: AVPV/PeN y ARC (Gottsch *et al.* 2004; Clarkson & Herbison 2006b) y su expresión está altamente regulada por estradiol y testosterona, de manera región-específica (Smith *et al.* 2005a; Smith *et al.* 2005b; Kauffman *et al.* 2007a; Kauffman *et al.* 2007b; Kim *et al.* 2011), jugando un rol importantísimo en la retroalimentación positiva y negativa de los esteroides sexuales.

Además de su expresión en el AVPV/PeN y ARC, *Kiss1* se expresa también, aunque en menor medida, en varias regiones extra-hipotalámicas, incluyendo la amígdala media (MeA) (Kim *et al.* 2011; Cao & Patisaul 2013) y el núcleo base de la estría terminal (BNST) (Xu *et al.* 2012b; Clarkson *et al.* 2009b; Brailoiu *et al.* 2005).

Aunque la expresión de *Kiss1* en áreas hipotalámicas (AVPV/PeN y ARC) y su rol en la reproducción han sido extensamente estudiados, la presencia e importancia de neuronas *Kiss1* en otras áreas del cerebro todavía se encuentra en discusión. Recientemente, el Dr. Kauffman y su grupo de trabajo han demostrado que los ratones y ratas macho tienen mayor número de neuronas *Kiss1* y mayor expresión de ARNm de *Kiss1* por célula que las hembras en MeA. Además, demostraron que la expresión de *Kiss1* en la amígdala es regulada positivamente por esteroides sexuales, tanto E₂ como T, en ambos sexos (Kim *et al.* 2011). Por otro lado, en ratas Xu y col. también demostraron que los estrógenos estimulan la expresión de *Kiss1* y de kisspeptina en AVPV/PeN, así como también en la MeA, BNST y el núcleo hipotalámico latero-ventromedial (IVMH). Además, demostraron que la sensibilidad a estrógenos del AVPV/PeN, IVMH y BNST es sexualmente dimórfica, con una mayor sensibilidad en las ratas hembras, mientras que el ARC y MeA no mostraron diferencias sexuales (Xu *et al.* 2012b). Recientemente, Cao y Patisaul reportaron que *Kiss1* no se detectaba en la MeA de ratas postnatales hasta aproximadamente 3 semanas de edad, sugiriendo que su expresión se eleva alrededor de la pubertad (Cao & Patisaul 2013).

A pesar de la presencia de neuronas *Kiss1* sensibles a esteroides en estas áreas extra-hipotalámicas, su función permanece incierta, como así también la posible regulación de estas neuronas por otros factores además de los esteroides sexuales.

Es interesante destacar que el BNST y la amígdala regulan el comportamiento socio-sexual de manera sexo específica (Paredes & Baum 1997; Simerly 1998; Crews 2005; Iwasaki *et al.* 2010). Es posible entonces que la kisspeptina originada de estos núcleos participe en la modulación de comportamientos sexualmente dimórficos como la monta (Huddleston *et al.* 2003) y lordosis (Rajendren & Moss 1993). Es más, la amígdala es la primera estación de conexión entre el sistema olfatorio y los núcleos reproductivos. De esta manera la kisspeptina de la amígdala podría participar en el procesamiento de feromonas, integrando la conducta sexual con la reproducción (Baum 2009). Es conocido, además, que la amígdala envía proyecciones a sitios blanco que participan en el control de la reproducción, incluyendo el APO, donde residen la mayoría de las neuronas de GnRH, el AVPV y el ARC (Kim *et al.* 2011). El BNST también integra estos circuitos ya que está conectado anatómicamente con la amígdala (Hines *et al.* 1992).

Como planteáramos en el capítulo anterior, hasta el momento, la interacción entre GABA y kisspeptina no está completamente caracterizada. Mientras varios grupos sugieren que kisspeptina podría interactuar con, o hasta modular directamente, la señalización de GABA hacia las neuronas GnRH (Neal-Perry *et al.* 2009; Pielecka-Fortuna & Moenter 2010; Garcia-Galiano *et al.* 2012; Cravo *et al.* 2011), poco se conoce sobre la capacidad recíproca de GABA de regular las neuronas *Kiss1*. En el capítulo anterior mostramos que en ratones adultos la falta de un RGABA_B funcional no afecta los niveles de expresión de *Kiss1* en el AVPV y el ARC. Sin embargo, un trabajo muy reciente ha demostrado que los RGABA_B participan en la regulación del comportamiento de lordosis (Sinchak *et al.* 2013), por lo que resultaba sumamente interesante dilucidar si la falta del RGABA_B afectaba de alguna manera las poblaciones de *Kiss1* ubicadas en zonas extra-hipotalámicas involucradas en la regulación de la conducta sexual.

OBJETIVO II

En base a los antecedentes mencionados, una vez analizados los núcleos específicos donde se expresa mayoritariamente *Kiss1* (AVPV/PeN y ARC) en el Capítulo I, en este capítulo nos propusimos evaluar la expresión de *Kiss1* en áreas extra-hipotalámicas involucradas indirectamente en la reproducción como lo son la MeA, el BNST y el *septum* lateral. Además, también decidimos evaluar si los cambios encontrados ocurrían antes del inicio de la pubertad o en la adultez, para lo cual determinamos la expresión de *Kiss1* en ratones de 14 días de edad (etapa pre-puberal en donde la diferenciación sexual del cerebro ya ha concluido) y en adultos de ambos sexos y ambos genotipos.

RESULTADOS II A. RATONES ADULTOS WT Y GABA_{B1}KO

ÁREAS EXTRA HIPOTALÁMICAS: EXPRESIÓN DE *KISS1* EN AMÍGDALA MEDIA (MEA)

Al analizar la expresión de *Kiss1* por HIS de marcación simple, observamos que el número de neuronas *Kiss1* en la MeA era mayor en machos que en hembras ($p < 0.001$), como fuera previamente descrito (Kim *et al.* 2011). Llamativamente, a diferencia de lo observado en AVPV/PeN y ARC, los ratones GABA_{B1}KO de ambos sexos tenían marcadamente mayor número de neuronas *Kiss1* con respecto a los WT en esta zona ($p < 0.0001$) (Figura 2.1). La expresión de *Kiss1* por neurona mostró el mismo patrón (Figura 2.1).

Al analizar la zona posterior ventral (MePV) o la zona posterior dorsal (MePD) de la amígdala encontramos los mismos resultados que para MeA (no mostramos estos resultados).

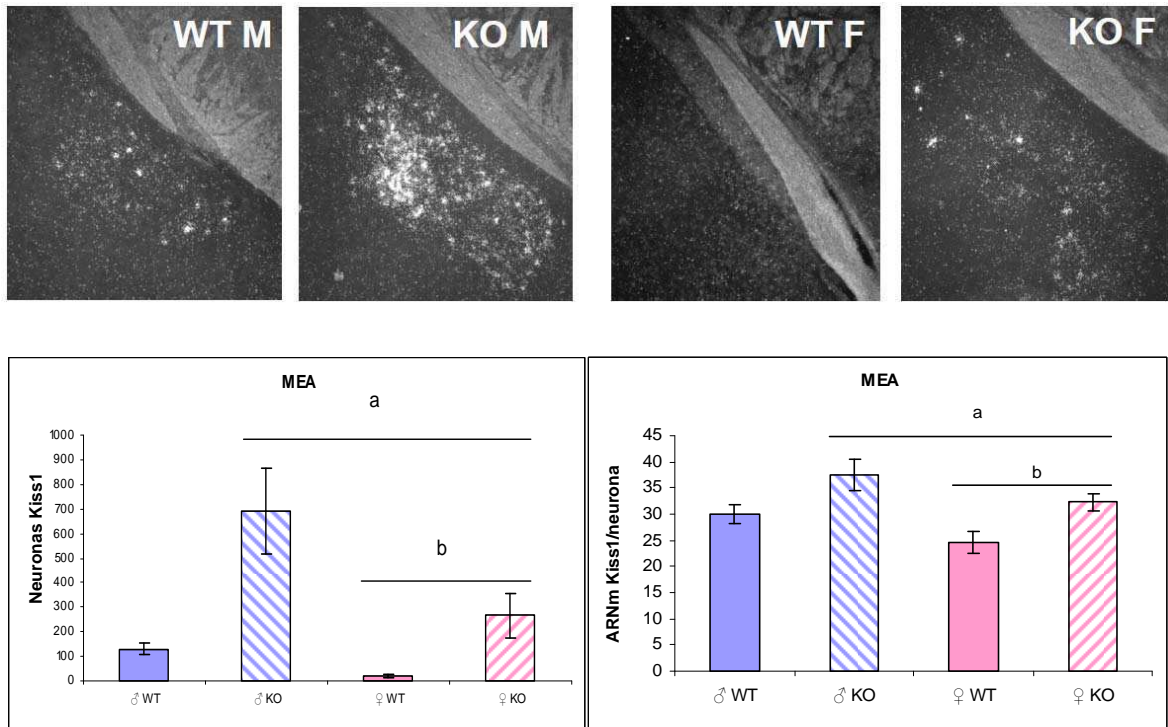


Figura 2.1: Expresión de *Kiss1* en amígdala media de ratones adultos WT y $GABA_{B1}KO$ (HIS). Arriba: Microfotografías representativas de la expresión de *Kiss1* en MeA. Abajo: Promedio del número de neuronas *Kiss1* en MeA (izquierda) y de la expresión del ARNm de *Kiss1* por neurona MeA (derecha). Número de neuronas *Kiss1*: ANOVA en dos sentidos, interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.001$, efecto principal genotipo $p < 0.0001$. ARNm *Kiss1*/neurona: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.03$, efecto principal genotipo $p < 0.01$. a: número de neuronas *Kiss1* o ARNm *Kiss1*/neurona de ratones $GABA_{B1}KO$ distinto de ratones WT. b: número de neuronas *Kiss1* o ARNm *Kiss1*/neurona de hembras distinto de machos. $N=7$.

ÁREAS EXTRA HIPOTALÁMICAS: EXPRESIÓN DE *KISS1* EN EL NÚCLEO BASE DE LA ESTRIA TERMINAL (BNST)

Los resultados sorprendentes que encontramos en cuanto a la expresión de *Kiss1* en MeA de los ratones $GABA_{B1}KO$ nos llevaron a examinar la expresión de *Kiss1* en otras regiones extra-hipotalámicas en estos ratones mediante la técnica de HIS. Primero evaluamos el BNST, el cual se encuentra en la zona dorso-lateral al AVPV/PeN, comunica con la MeA y ha sido implicado en la regulación del comportamiento sexual (Simerly 1998; Iwasaki *et al.* 2010).

Confirmando resultados previos, encontramos niveles bajos de *Kiss1* pero detectables en el BNST de ratones adultos WT, con un número mayor de neuronas *Kiss1* en machos que en hembras ($p < 0.01$) (Figura 2.2). Sorpresivamente, como en la MeA, encontramos además que en el BNST de ratones $GABA_{B1}KO$ había muchas más

neuronas *Kiss1* que en los WT ($p < 0.0001$), manteniendo la misma diferencia sexual. Sin embargo, la expresión de *Kiss1*/neurona fue similar entre los grupos (Figura 2.2).

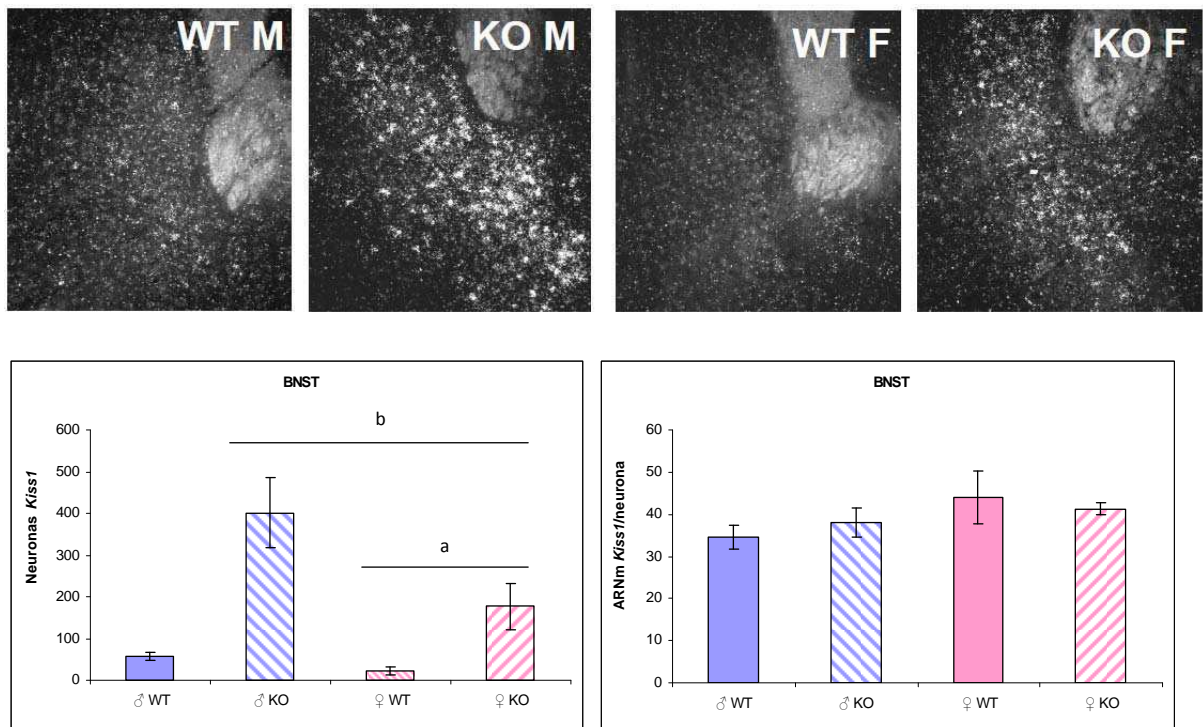


Figura 2.2: Expresión de *Kiss1* en el núcleo base de la estría terminal de ratones adultos WT y $GABA_{B1}KO$ (HIS). Arriba: Microfotografías representativas de la expresión de *Kiss1* en BNST. Abajo: Promedio del número de neuronas *Kiss1* en BNST (izquierda) y de la expresión del ARNm de *Kiss1* por neurona en BNST (derecha). Número de neuronas *Kiss1*: ANOVA en dos sentidos, interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.01$, efecto principal genotipo $p < 0.0001$. a: número de neuronas *Kiss1* de hembras distinto de machos. b: número de neuronas *Kiss1* de ratones $GABA_{B1}KO$ distinto de ratones WT. ARNm *Kiss1*/neurona: ANOVA en dos sentidos NS. N=7.

ÁREAS EXTRA HIPOTALÁMICAS: EXPRESION DE *KISS1* EN EL *SEPTUM LATERAL*

Cuando estábamos realizando el conteo de neuronas *Kiss1* en el BNST, observamos que en algunos ratones parecía haber expresión de *Kiss1* en el área septal, localizada en la zona antero-dorsal al BNST. Por lo tanto decidimos evaluar la expresión de *Kiss1* en todos los animales en esta región mediante HIS.

En el *septum* lateral, donde normalmente hay escasa o nula expresión de *Kiss1* en ratones WT, encontramos, como en MeA y BNST, un incremento importantísimo en el número de neuronas *Kiss1* en los animales $GABA_{B1}KO$ con respecto a los WT, sin

diferencias sexuales ($p < 0.0001$). El mismo patrón se observó para la expresión de *Kiss1*/neurona ($p < 0.01$) (Figura 2.3).

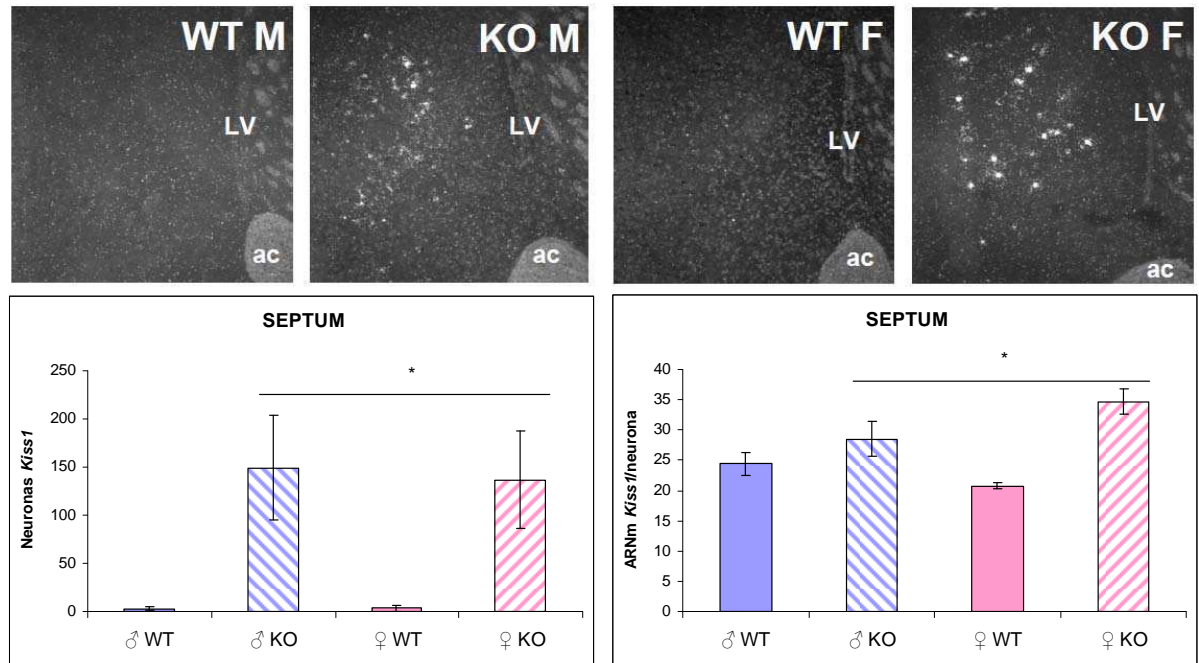


Figura 2.3: Expresión de *Kiss1* en el *septum* lateral de ratones adultos WT y $GABA_{B1}KO$ (HIS). Arriba: Microfotografías representativas de la expresión de *Kiss1* en *septum*. Ac: comisuras anteriores, LV: ventrículo lateral. Abajo: Promedio del número de neuronas *Kiss1* en *septum* (izquierda) y de la expresión del ARNm de *Kiss1* por neurona *septum* (derecha). Número de neuronas *Kiss1*: ANOVA en dos sentidos, interacción NS, efecto principal genotipo $p < 0.0001$. *Kiss1*/neurona: ANOVA en dos sentidos, interacción NS, efecto principal genotipo $p < 0.01$. *: Número de neuronas *Kiss1* o *Kiss1*/neurona de ratones $GABA_{B1}KO$ distinto de ratones WT. $N=7$.

Estos resultados demuestran que si bien la falta de un receptor $GABA_B$ funcional no afecta la expresión de *Kiss1* en el AVPV/PeN y ARC, su ausencia afecta en forma muy marcada la expresión de *Kiss1* en estas otras áreas relacionadas con la conducta sexual, como la MeA, el BNST y el *septum* lateral.

EXPRESIÓN DE *KISS1* EN MICROPUNCHES DE ÁREAS EXTRA HIPOTALÁMICAS: MEA, BNST Y *SEPTUM* (QPCR)

Los resultados obtenidos mediante la técnica de HIS indicaron un dramático incremento en la expresión de *Kiss1* en las tres áreas extra-hipotalámicas evaluadas (MeA, BNST y *septum*) pero no en las dos poblaciones principales (AVPV/PeN y ARC). Dado que la técnica de HIS es semi-cuantitativa, decidimos analizar la expresión de

Kiss1 mediante qPCR en *micropunches* de estas mismas áreas extra-hipotalámicas para determinar en forma cuantitativa los niveles de *Kiss1* en estas poblaciones neuronales.

Los niveles absolutos de *Kiss1* en ratones GABA_{B1}KO fueron mucho más altos con respecto a los WT en las tres regiones extra-hipotalámicas evaluadas ($p < 0.05$) (Figura 2.4). En el único caso en donde se observó una diferencia sexual fue en la MeA, en donde los machos WT presentaron un mayor número de copias con respecto a las hembras WT (similar a los resultados obtenidos por HIS), mientras que esta diferencia se perdió en los ratones GABA_{B1}KO (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$).

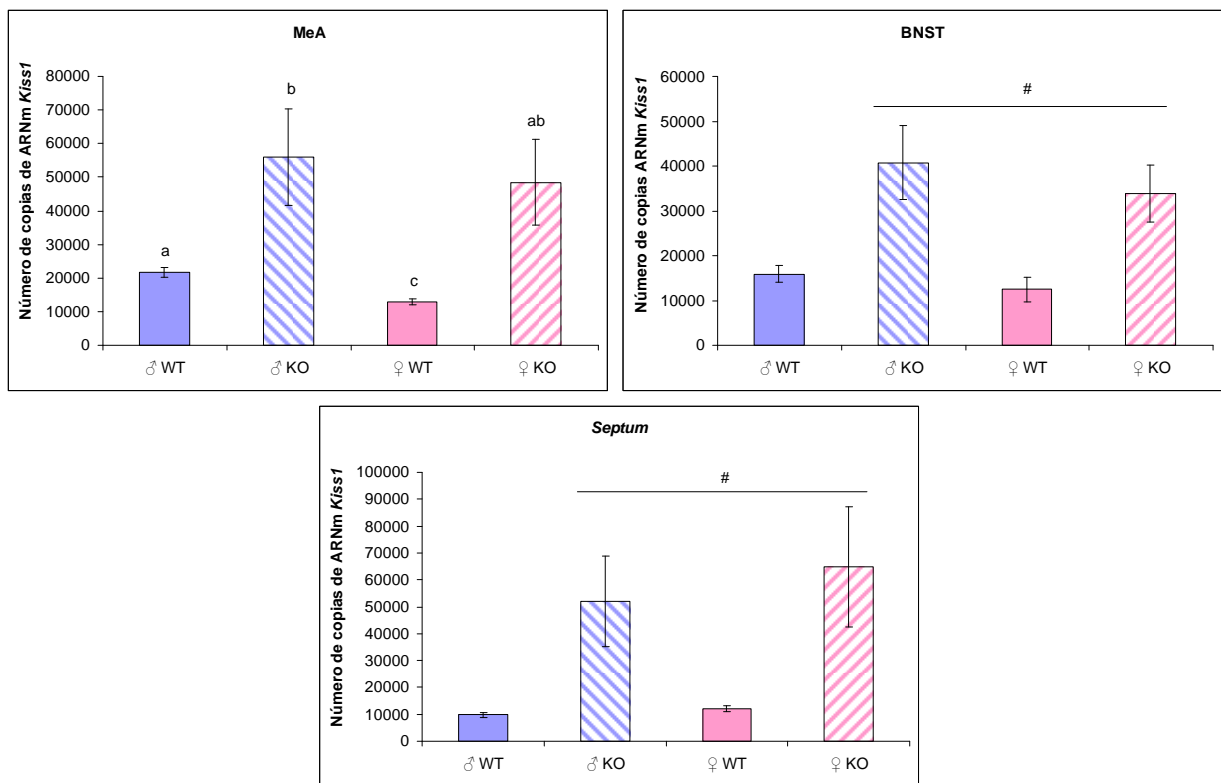


Figura 2.4: Promedio del número de copias del ARNm de *Kiss1* (qPCR) en *micropunches* de MeA (arriba, izquierda), BNST (arriba, derecha) y *septum* (abajo) tomados a partir de ratones adultos WT y GABA_{B1}KO. ANOVA en dos sentidos para MeA: interacción $p < 0.02$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). ANOVA en dos sentidos para BNST y *septum*: interacción NS, efecto principal genotipo $p < 0.001$. *Kiss1* en ratones GABA_{B1}KO distinto de *Kiss1* en ratones WT. N=5-10.

Por lo tanto estos resultados presentaron un patrón similar y confirmaron los resultados obtenidos por medio de la técnica de HIS, en donde el resultado más inesperado fue el aumento drástico de *Kiss1* en estas tres áreas evaluadas. Cabe mencionar que mientras por HIS se observó una diferencia sexual en el BNST, ésta no

alcanzó significancia estadística por qPCR, probablemente porque se analizó en menor número de muestras.

Además, los niveles gonadales y séricos de las hormonas esteroideas no se encontraban alterados en los ratones GABA_{B1}KO (Resultados presentados en el Capítulo I), por lo que este aumento dramático de *Kiss1* en áreas extra-hipotalámicas no se debe a los esteroides sexuales, sino más bien a la falta de un RGABA_B funcional.

RESULTADOS II B. RATONES DE 14 DÍAS DE EDAD WT Y GABA_{B1}KO

Dado que encontramos importantísimas alteraciones en los niveles de *Kiss1* en áreas extra-hipotalámicas (MeA, BNST y *septum*) en ratones adultos GABA_{B1}KO, decidimos evaluar si este aumento en la expresión se encontraba presente durante el desarrollo, antes del inicio de la pubertad. Por lo tanto analizamos la expresión hipotalámica, en AVPV/PeN y ARC, y extra-hipotalámica, en MeA y BNST, de *Kiss1* mediante la técnica de HIS en ratones WT y GABA_{B1}KO de 14 días de edad.

EXPRESIÓN DE *KISS1* EN ÁREAS HIPOTALÁMICAS Y EXTRA-HIPOTALÁMICAS (HIS)

Llamativamente, no encontramos alteraciones en la expresión de *Kiss1* debido al genotipo a esta edad (Figura 2.5), a diferencia de lo observado en la adultez, en ninguna de las cuatro áreas evaluadas. En MeA, *Kiss1* presentó niveles bajísimos, prácticamente indetectables en todos los grupos pre-puberales, coincidiendo con resultados previos (Cao & Patisaul 2013), independientemente del sexo o el genotipo (Figura 2.5). Por el contrario, la expresión de *Kiss1* fue mayor en AVPV/PeN y ARC que en la MeA y fue sexualmente dimórfica en cada región (mayor en hembras con respecto a machos, $p < 0.05$), como fuera previamente descrito (Poling & Kauffman 2012a) (Figura 2.5). Los niveles prepuberales de *Kiss1* en BNST también fueron detectados pero no presentaron diferencias entre los grupos (Figura 2.5). En la figura 2.5 se muestra el número de neuronas *Kiss1* para cada área evaluada. La expresión de *Kiss1*/neurona en las cuatro áreas presentó patrones similares (datos no mostrados).

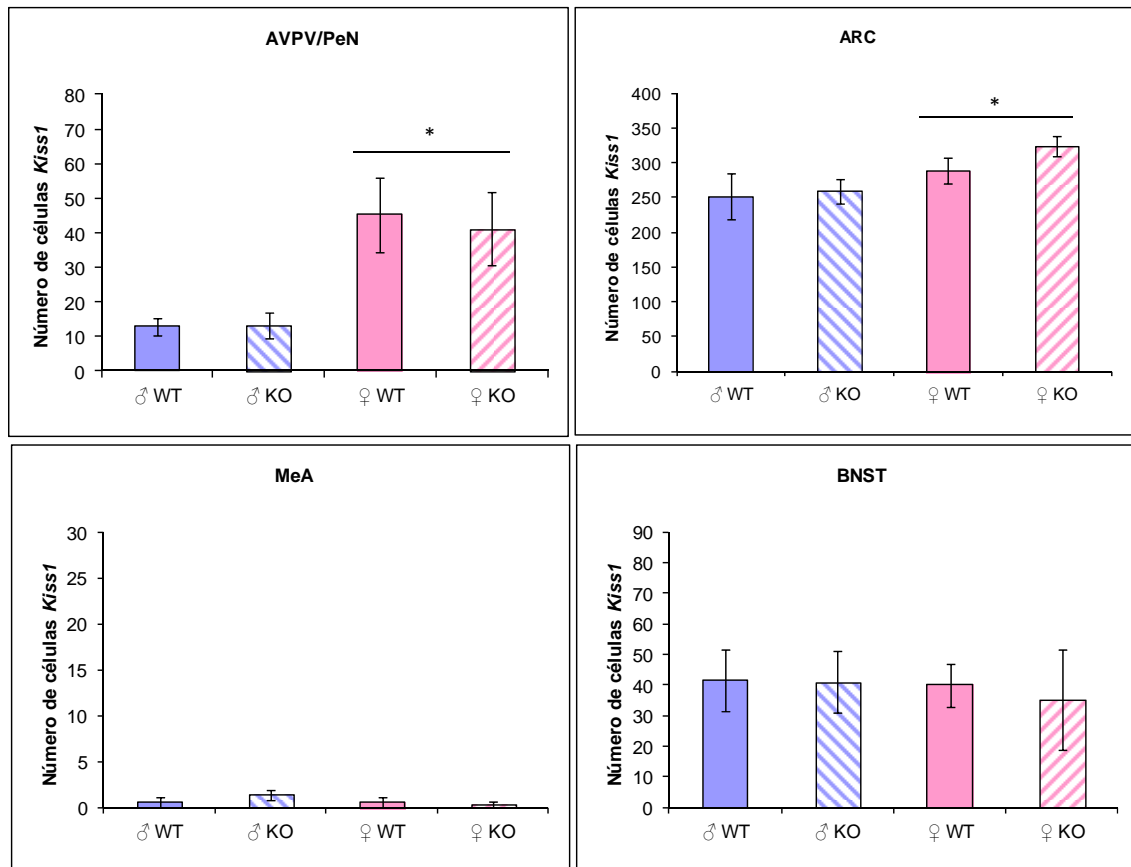


Figura 2.5: Promedio del número de neuronas *Kiss1* en AVPV/PeN (arriba, izquierda), ARC (Arriba, derecha), MeA (Abajo, izquierda) y BNST (Abajo, derecha) de ratones WT y $GABA_{B1}KO$ de 14 días de edad (HIS). AVPV/PeN y ARC: ANOVA en dos sentidos para cada determinación, interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.05$. Número de neuronas *Kiss1* en hembras distinto de machos. MeA y BNST: ANOVA en dos sentidos para cada determinación: interacción NS. N=6-7.

Estos resultados indican que el aumento dramático en la expresión de *Kiss1* observado en las áreas extra-hipotalámicas de los ratones adultos $GABA_{B1}KO$ no se encontrarían presentes durante el desarrollo en ratones hasta los 14 días de edad, y surgirían, probablemente, durante o después del inicio de la pubertad. Además, estos resultados demuestran que la expresión de este gen está regulada en forma área-específica, dado que en etapas juveniles ya es detectable en ciertas áreas, como el AVPV/PeN, ARC y BNST, y no en otras como la MeA.

ENTORNO HORMONAL DE RATONES WT Y GABA_{B1}KO A LOS 14 DÍAS DE EDAD

Dado que la etapa juvenil es hormonalmente muy diferente a la adultez, quisimos evaluar los niveles hormonales de los animales en los que habíamos evaluado la expresión de *Kiss1*.

CONTENIDO HIPOFISARIO Y NIVELES SÉRICOS DE GONADOTROFINAS (RIA)

Para evaluar los parámetros hipofisarios cuantificamos tanto el contenido hipofisario como los niveles séricos de LH y FSH.

En cuanto al contenido de LH, encontramos que depende del sexo y del genotipo (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$). Las hembras WT presentaban un contenido hipofisario de LH mayor que los machos WT ($p < 0.04$). Sin embargo, esta diferencia sexual se perdió en los ratones GABA_{B1}KO (Figura 2.6 arriba). Cuando analizamos los niveles séricos de LH, encontramos que también dependían del sexo y del genotipo (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.04$). Sin embargo, el patrón fue distinto al encontrado en el contenido hipofisario. Los niveles séricos de ratones WT no diferían entre sexos, pero las hembras GABA_{B1}KO presentaban aumentados los niveles séricos de LH con respecto a los machos GABA_{B1}KO ($p < 0.02$) y además presentaban una tendencia a ser mayores que las hembras WT ($p = 0.11$) (Figura 2.6 arriba).

Por otro lado, tanto el contenido hipofisario de FSH como los niveles séricos de esta hormona (Figura 2.6 abajo) fueron similares entre los grupos.

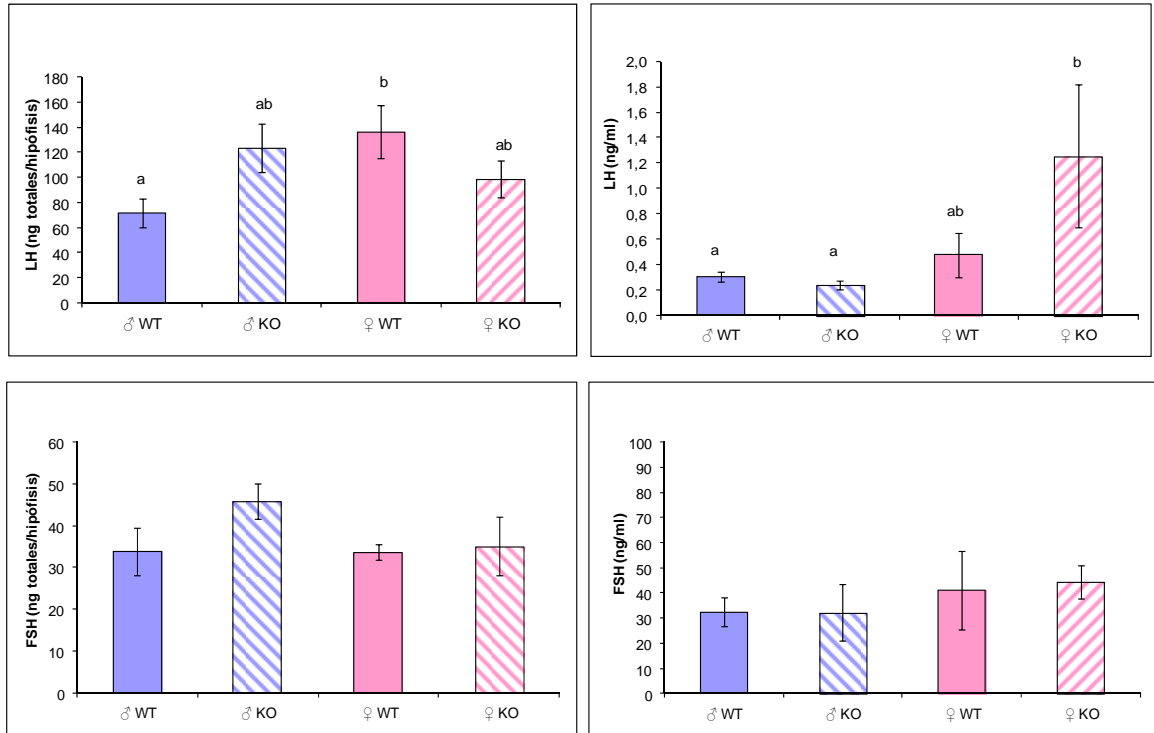


Figura 2.6: Contenido hipofisario (ng totales/hipófisis, izquierda) y niveles séricos (ng/ml, derecha) de LH (arriba) y FSH (abajo) (RIA) en ratones de 14 días de edad, WT y GABA_{B1}KO. Contenido y sérico de LH: ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.05$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). N (LH y FSH sérico): 4-8. N (contenido LH y FSH)=6-12.

CONTENIDO DE ESTEROIDES GONADALES (RIA)

Además, evaluamos el contenido gonadal de estradiol y testosterona para determinar si existía alguna alteración a nivel gonadal en los ratones GABA_{B1}KO a esta edad.

El contenido de E₂ y T fue similar entre los genotipos en cada sexo (Figura 2.7). Por lo tanto, al igual que en los ratones adultos, no se observa un efecto por la falta del receptor a nivel del contenido gonadal de estas hormonas esteroides.

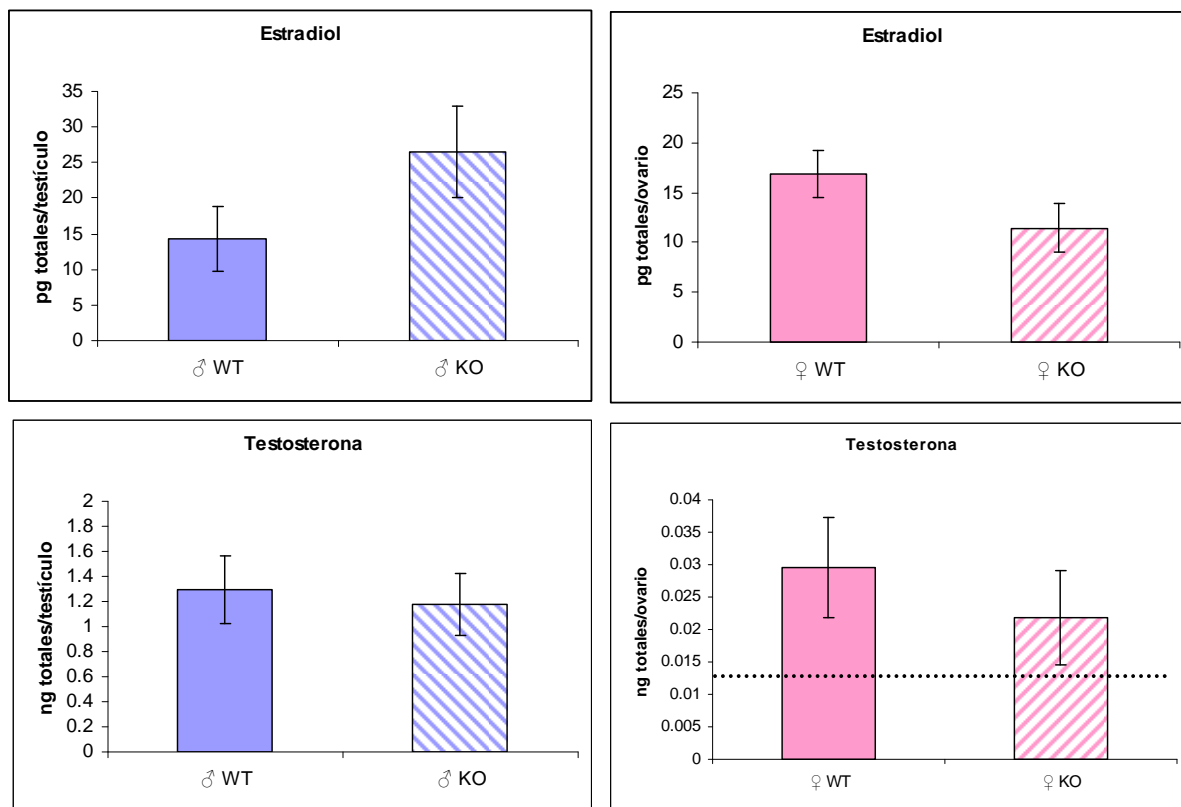


Figura 2.7: Contenido gonadal de estradiol (arriba, pg totales/gónada) y testosterona (abajo, ng totales/gónada) (RIA) en machos (izquierda) y hembras (derecha) de 14 días de edad, WT y GABA_{B1}KO. Test t para cada determinación NS. La línea punteada en testosterona (ovarios) indica el límite de detección del ensayo: 0.0125ng. N=5-7.

PESO DE GÓNADAS Y ÚTERO

Luego comparamos los pesos corporales de los ratones de 14 días y no encontramos diferencias significativas entre ellos (Hembras WT: 6.14 ± 0.63 gr; Hembras GABA_{B1}KO: 6.71 ± 0.57 gr. Test t NS. N=7-10). Al analizar los pesos ováricos y uterinos tampoco encontramos diferencias significativas entre los genotipos (Figura 2.8).

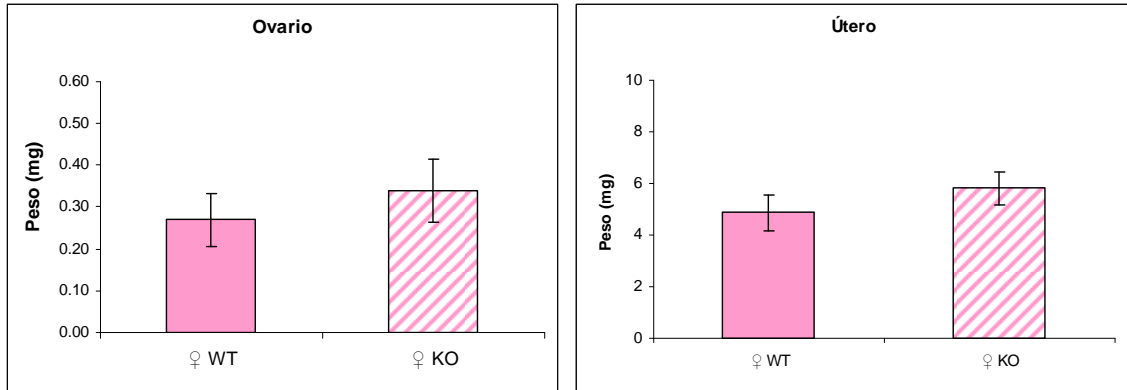


Figura 2.8: peso (mg) del ovario (izquierda) y del útero (derecha) en hembras de 14 días WT y GABA_{B1}KO. Test t para cada determinación NS. N=7-10.

Los machos tampoco difieren entre genotipos en el peso corporal (Machos WT: 8.86 ± 0.80 gr; Machos GABA_{B1}KO: 8.57 ± 0.64 gr. Test t NS. N=5-6) ni en el peso testicular (Figura 2.9).

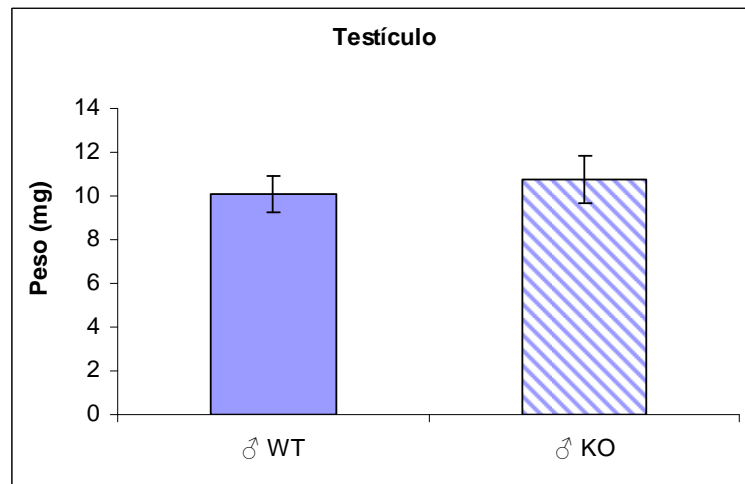


Figura 2.9: peso (mg) del testículo en machos de 14 días WT y GABA_{B1}KO. Test t para cada determinación NS. N=5-6.

Estos resultados corroboran los obtenidos al analizar los contenidos gonadales de E₂ y T en donde no se observaron diferencias genotípicas dentro de cada sexo.

En el Capítulo I demostramos que la falta del RGABA_B no modifica la expresión de *Kiss1* en los núcleos hipotalámicos AVPV/PeN y ARC, a pesar que la co-localización de estos dos mensajeros es altísima en estas regiones. A pesar que las poblaciones de *Kiss1* en estos núcleos son las más importantes, existe evidencia de pequeñas subpoblaciones de neuronas *Kiss1* en regiones extra-hipotalámicas, como MeA y BNST (Brailoiu *et al.* 2005; Clarkson *et al.* 2009b; Kim *et al.* 2011; Xu *et al.* 2012b; Cao & Patisaul 2013), aunque el rol fisiológico en estas regiones se encuentra en investigación.

En este capítulo nos propusimos estudiar la expresión de *Kiss1* en áreas extra-hipotalámicas involucradas indirectamente en la reproducción como lo son la MeA, el BNST y el *septum* lateral en dos etapas del desarrollo: en la adultez y en una etapa pre-puberal (14 días postnatales).

Expresión de *Kiss1* en áreas extra-hipotalámicas en la adultez

De manera interesante, y en contraste con lo observado en AVPV/PeN y ARC, encontramos un aumento dramático de la expresión de *Kiss1* en estas áreas extra-hipotalámicas en los ratones GABA_{B1}KO. Tanto en MeA como en BNST, la expresión de *Kiss1* fue mayor en machos que en hembras, y además, *Kiss1* se encontró muy aumentado en los ratones GABA_{B1}KO de ambos sexos (Tabla 2.1). La expresión de *Kiss1* en la MeA y BNST está regulada positivamente por esteroides sexuales, primariamente vía señalización de receptores de estrógeno (Kim *et al.* 2011; Xu *et al.* 2012b), pero los niveles de éstos no estaban alterados en los ratones GABA_{B1}KO.

Todavía queda por dilucidar las implicancias de este dramático aumento en la expresión de *Kiss1* en el MeA y BNST en los ratones GABA_{B1}KO y si correlacionan con los niveles peptídicos de kisspeptina, pero nuestros resultados nos permiten especular que bajo condiciones normales, la expresión de *Kiss1* en estas regiones está regulada negativamente por los RGABA_B, quizás exclusivamente durante la adultez. Sin embargo, hasta el momento, desconocemos si este efecto es directo a través de los RGABA_B presentes en las neuronas *Kiss1* o es indirecto a través de interneuronas que

estarían regulando a *Kiss1* en estas zonas. La co-localización de *RGABA_{B1}* en las neuronas *Kiss1* de las regiones extra-hipotalámicas es difícil de determinar con las técnicas de HIS doble tradicionales dado los bajos niveles de expresión de *Kiss1* en estas regiones, que limitan la detección de las neuronas *Kiss1* con sondas unidas a DIG (observaciones no publicadas del Dr. AS Kauffman).

Antecedentes previos sugieren que GABA podría potencialmente señalar directamente, a través de *RGABA_B*, hacia las neuronas *Kiss1* en la MeA y el BNST (Grimes *et al.* 2003; Jaferi *et al.* 2011; Pleil *et al.* 2012). Además, la síntesis de GABA se ha demostrado en la MeA en distintas especies de roedores, incluyendo el ratón (Grimes *et al.* 2003; Simmons & Yahr 2003; Oberto *et al.* 2001), y ambos *RGABA_A* y *RGABA_B* están presentes en estas región y en el BNST (Tasan *et al.* 2011). La MeA y el BNST son conocidas por participar en una gran variedad de procesos y funciones, incluyendo la modulación de comportamientos sociales y sexuales a través de la integración de los factores ambientales con las señales hormonales. Lesiones de la MeA alteran el comportamiento sexual masculino en roedores (Lehman *et al.* 1980; Kondo 1992), mientras que lesiones de la amígdala posterior disminuye la receptividad sexual en las ratas hembra (Masco & Carrer 1980). Además, cada sub-región de la amígdala envía y recibe proyecciones desde y hacia otros núcleos amigdaloides, así como también a otros núcleos cerebrales (Canteras *et al.* 1992; Simerly 2002; Cooke & Simerly 2005; Maras & Petrulis 2010), incluyendo el BNST, APO y el hipotálamo anterior (Coolen & Wood 1999; Manzo *et al.* 1999; Simerly 2002). Por otro lado, tanto el AVPV como el núcleo preóptico medio, los cuales juegan un rol fundamental en el control de la ovulación y los comportamientos copulatorios del macho, respectivamente, reciben señalización proveniente del sistema olfatorio a través del BNST y la MeA (Simerly 1990). El BNST, que también ha sido postulado como un área crítica para la expresión normal de los comportamientos de respuesta de la hembra a los estímulos del macho en los roedores, gobierna aspectos de saciedad sexual y también influencia el comportamiento maternal (Martinez & Petrulis 2011; Perrin *et al.* 2007; Parfitt & Newman 1998).

Con respecto a GABA, el sistema GABAérgico en la amígdala modula el miedo y la ansiedad bajo condiciones fisiológicas y alteraciones del *RGABA_A* en esta zona predispondría a los individuos a ansiedad patológica (Tasan *et al.* 2011). Sin embargo,

se conoce muy poco sobre el rol de los RGABA_B en la amígdala. Baclofén, agonista RGABA_B, induce una disminución en el fluido cerebral en esta zona (Franklin *et al.* 2012). Por otro lado, CGP56999A, antagonista RGABA_B, induce convulsiones originadas en esta zona (Tsai *et al.* 2008).

En el BNST, GABA, a través de los RGABA_A está implicado en comportamiento de ansiedad y miedo, así como también en respuestas al estrés crónico (Sajdyk *et al.* 2008; Ventura-Silva *et al.* 2012; Xu *et al.* 2012a), pero el rol de los RGABA_B es poco claro. Además, el BNST modula aspectos del comportamiento maternal, y GABA, actuando a través de los RGABA_A y RGABA_B, participa en estos efectos (Arrati *et al.* 2006).

Kisspeptina originada en estos núcleos podría, en teoría, participar de la modulación de alguno de todos estos procesos, aunque todavía no ha sido estudiado en detalle. Hasta este momento, sólo hay un trabajo que intenta dilucidar el rol, si es que hay alguno, de kisspeptina en los comportamientos de ansiedad en roedores (Csabafi *et al.* 2013). En este trabajo determinaron que el tratamiento con kisspeptina induce comportamientos de ansiedad. Sin embargo, todavía no se sabe si la kisspeptina proveniente de la MeA o el BNST tiene efectos similares, y si es así, si la señalización de kisspeptina está modulada por los RGABA_B.

Junto con el aumento dramático de *Kiss1* en la MeA y el BNST, también encontramos un aumento pronunciado en la expresión de *Kiss1* en el *septum* lateral de los ratones GABA_{B1}KO, una región donde la expresión de *Kiss1* es prácticamente indetectable en los ratones WT (Tabla 2.1). De nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se demuestra la expresión de *Kiss1* en el *septum* lateral en ratones que no son transgénicos para *Kiss1*. Sin embargo, resultados previos en ratones *Kiss1*-Cre demostraron bajos niveles de expresión de Cre en el *septum* lateral (Dungan Lemko & Elias 2012). Mientras que algunos autores interpretaron esta expresión como ectópica, dado que una expresión similar no había sido descrita en ratones normales, los resultados presentes en este Capítulo confirman que esa expresión en el *septum* lateral podría ser posible, y puede ser puesta en evidencia cuando la inhibición del RGABA_B disminuye o se remueve completamente, como en el caso de nuestro modelo de ratones GABA_{B1}KO. De hecho, los RGABA_B están presentes en esta región (Liang *et*

al. 2000) y se encuentran activos, dado que la administración sistémica de anfetaminas induce un aumento en el *septum* lateral de la liberación de GABA y consecuente activación de los RGABA_B, dando lugar al efecto directo de las anfetaminas en la liberación de dopamina en el *septum* lateral (Sotomayor-Zarate *et al.* 2010). Aunque el rol de las neuronas *Kiss1* en el *septum* lateral aún no se conoce, su expresión en esta región también parece estar bajo regulación negativa de los RGABA_B.

Cabe destacar que estas alteraciones en los niveles de expresión de *Kiss1* en las tres áreas extra-hipotalámicas evaluadas en los ratones adultos no se deberían a alteraciones de los esteroides gonadales, ya que como se estudió en el Capítulo I, no presentaban diferencias debido al genotipo. Por lo cual atribuimos esta expresión desmedida de *Kiss1* en la MeA, el BNST y el *septum* lateral a la falta de señalización del RGABA_B en vez de a un efecto secundario debido a altos niveles de esteroides sexuales.

Si bien el dramático aumento en la expresión de *Kiss1* en MeA y BNST de ratones adultos fue confirmado por los ensayos de qPCR en los *micropunches*, las diferencias sexuales observadas por HIS para BNST no fueron corroboradas por qPCR, indicando probablemente variaciones en las áreas analizadas con cada técnica o que el número de muestras analizadas por qPCR en este tejido fue menor.

Expresión de *Kiss1* en áreas extra-hipotalámicas a los 14 días de edad

El aumento de expresión de *Kiss1* observado en los ratones adultos GABA_{B1}KO no se encontró en los ratones de ambos sexos en la etapa pre-puberal estudiada (14 días de edad) (Tabla 2.1). En la MeA, casi no se encontraron neuronas *Kiss1* en los grupos estudiados, incluyendo los ratones WT, sugiriendo que la expresión de *Kiss1* está regulada durante el desarrollo y aumenta durante o posteriormente al inicio de la pubertad. Esto concuerda con un trabajo reciente en ratas, donde demuestran que no hay expresión de *Kiss1* en la MeA de hembras a los 19 días de edad (Cao & Patisaul 2013). En el BNST, se detectaron niveles de expresión de *Kiss1* bajos pero significativos en todos los grupos, indicando que *Kiss1* está expresado en esta región previo a la pubertad, tanto en ratones WT como GABA_{B1}KO, pero en menores niveles que en la adultez. En cuanto a estos resultados, la ausencia de una expresión aumentada de *Kiss1* en el BNST de ratones GABA_{B1}KO pre-puberales indica un rol de los RGABA_B en la regulación de *Kiss1* en esta región, como sucede en la MeA, que no está presente en

todas las edades, pero aparece en algún momento del desarrollo después de los 14 días de edad, posiblemente cerca de la pubertad.

Tabla 2.1: Comparación del número de neuronas *Kiss1*, LH (contenido hipofisario y niveles séricos) y esteroides gonadales entre etapa pre-puberal (14 días postnatales) y la adultez. SD: sin datos.

		14 días (pre-puberal)	Adultos
<i>Kiss1</i>	<i>AVPV/PeN</i>	H>M	H>M
	<i>ARC</i>	H>M	=
	<i>MeA</i>	casi indetectable, =	M>H; KO>WT
	<i>BNST</i>	=	M>H; KO>WT
	<i>Septum lateral</i>	SD	KO>WT
LH	<i>Contenido</i>	WT: H>M; KO: H=M	M>H
	<i>Sérico</i>	WT: H=M; KO: H>M	M>H
Esteroides	<i>E2</i>	=	=
	<i>T</i>	=	=

CONCLUSIÓN II

En resumen, estos resultados novedosos indican que bloquear la señalización de GABA, a través de sus RGABA_B, puede alterar dramáticamente la expresión de *Kiss1* de manera región-específica, particularmente en la MeA, el BNST y el *septum lateral*. Dado que estas regiones están involucradas en la regulación de comportamientos sociales y reproductivos, esta expresión anormal podría causar alteraciones que contribuyen al fenotipo observado en la adultez en los ratones GABA_{B1}KO y resalta la importancia de estudiar otras poblaciones kisspeptidérgicas por fuera del hipotálamo. En base a estos resultados, sería de gran interés realizar estudios de IHQ para kisspeptina y estudios comportamentales para determinar si estos incrementos en la expresión del gen llevan a aumentos de la proteína y a cambios en la conducta de los animales. Estos resultados, además, demuestran la importancia de evaluar diferentes etapas del desarrollo al analizar los mecanismos regulatorios.

INTRODUCCIÓN III

Los embriones y las crías recién nacidas están expuestos a hormonas esteroideas que provienen tanto de la síntesis materna, de sus propias gónadas y de la síntesis local en sus cerebros. En los machos se producen dos picos de T, uno en el día E18 (intrauterino) y otro a DPN1. El E₂, producido por aromatización de esta T, ejerce efectos organizacionales permanentes en el cerebro en desarrollo diferenciándolo hacia macho. Esta diferenciación sexual del cerebro establece la respuesta hormonal en el adulto que comanda la fisiología y el comportamiento específico de cada sexo.

El GABA, entre otros, es una de las moléculas clave seleccionadas por el E₂ para comandar el desarrollo de los circuitos cerebrales y las poblaciones neuronales (Schwarz & McCarthy 2008a). Como mencionáramos, el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC en mamíferos adultos. Sin embargo, en el cerebro en desarrollo, es la principal fuente de excitación neuronal, influenciando el desarrollo del SNC y participando en el establecimiento de algunos núcleos hipotalámicos sexualmente dimórficos (McCarthy *et al.* 2002; Schwarz & McCarthy 2008a; Maffucci & Gore 2009). El GABA participa en la regulación del eje reproductivo a distintos niveles y durante todos los estadios del desarrollo, desde la migración de neuronas GnRH en etapas tempranas hasta el pico pre-ovulatorio de LH en la adultez (Maffucci & Gore 2009).

En cuanto a los efectos del GABA sobre la secreción de GnRH, se sabe que la activación de los RGABA_A estimula la liberación de GnRH en etapas tempranas del desarrollo pero que la inhibe en etapas tardías (Maffucci & Gore 2009; Herbison & Moenter 2011; Garcia-Galiano *et al.* 2012). La estimulación de los RGABA_A también modula la expresión de *Gnrh1* de manera específica para cada especie, edad y modelo evaluado (Fueshko *et al.* 1998b; Fujioka *et al.* 2007). Sin embargo, ratones que no poseen un RGABA_A funcional en las neuronas GnRH presentan mínimos efectos sobre la fertilidad (Lee *et al.* 2010). En cuanto a los RGABA_B, se ha descrito un efecto inhibitorio en la liberación de GnRH y LH (Akema & Kimura 1992; Martinez *et al.* 1994;

Moguilevsky & Wuttke 2001; Constantin *et al.* 2012). Sin embargo se conoce muy poco, especialmente durante el desarrollo, sobre la regulación de la expresión de *Gnrh1* mediada por RGABA_B. Se ha reportado que el agonista de los RGABA_B, baclofén, disminuye la expresión de *Gnrh1* en el APO de ratas adultas ovariectomizadas (Bergen *et al.* 1991) pero la estimula en ratas adultas tratadas con esteroides (Kang *et al.* 1995; Cho & Kim 1997), sugiriendo que la señalización de los RGABA_B debe estar influenciada por los esteroides gonadales. Además, como lo mencionamos previamente, el GABA regula la migración de las neuronas GnRH. La activación de RGABA_A inhibe la migración de las neuronas GnRH en explantos nasales (Heger *et al.* 2003; Lee *et al.* 2008a; Wierman *et al.* 2011). Estudios farmacológicos sugieren que los RGABA_B no participan en este evento (Tobet *et al.* 2001; Maffucci & Gore 2009), sin embargo, dado que los RGABA_B: a) están presentes en las neuronas GnRH en migración (Tobet *et al.* 2001; Fujioka *et al.* 2007), b) participan en la migración y diferenciación neuronal de otras neuronas (McClellan *et al.* 2008; Bony *et al.* 2013), c) están presentes en células progenitoras (Fukui *et al.* 2008; Schwirtlich *et al.* 2010), y d) participan en la diferenciación sexual de varios núcleos hipotalámicos inducida por E₂ (Tu *et al.* 2007; Fiorentino *et al.* 2009), su participación en la migración de neuronas GnRH y en la regulación de la expresión de *Gnrh1* requiere de mayor investigación.

Recientemente se ha estudiado el importante rol de las neuronas de kisspeptina en la diferenciación sexual del cerebro, a la vez que su expresión sexualmente diferenciada es regulada por los estrógenos (Kauffman 2010). El correcto desarrollo del sistema kisspeptidérgico durante el periodo neonatal determina el buen funcionamiento del eje reproductivo en la adultez, esencial para el mantenimiento de la especie (Kauffman 2010). Además, *Kiss1* del ARC se ha postulado como un novedoso estimulador del crecimiento axonal de neuronas de GnRH al día gestacional 13.5, posiblemente para facilitar la inervación de las fibras de GnRH hacia la EM (Fiorini & Jasoni 2010).

Sin embargo, como vimos anteriormente, la interacción entre GABA y el sistema kisspeptidérgico ha sido poco estudiada. En relación a ello, se sabe que la activación de las neuronas GnRH por kisspeptina en ratones adultos, en presencia de E₂, puede estar mediada directa o indirectamente por neuronas GABAérgicas o glutamatérgicas (Pielecka-Fortuna *et al.* 2008). Además, Zhang y col. (Zhang *et al.* 2009) han

demostrado que mientras que los agonistas de RGABA_B hiperpolarizan las neuronas GnRH en la adultez, esta respuesta se elimina por el agregado de Kiss-10 (análogo sintético de kisspeptina), sugiriendo una interacción entre la señalización de kisspeptina y RGABA_B en la regulación de GnRH.

Tanto en resultados previos del laboratorio (Catalano *et al.* 2005) como en los resultados descritos en los capítulos anteriores hemos demostrado que la ausencia del RGABA_B funcional provoca alteraciones en el eje reproductivo de ratones adultos, principalmente en las hembras GABA_{B1}KO, incluyendo aumento en la pulsatilidad de GnRH, alteraciones en la respuesta hipotalámica a kisspeptina, disrupción de los ciclos estrales, disminución en el segundo pico de FSH y el porcentaje de ovulación, e infertilidad. Estas alteraciones reproductivas están asociadas con cambios en la expresión sexualmente dimórfica de *Gnrh1*, *Gad1* (Catalano *et al.* 2010), *Pgr* y *Th* en el hipotálamo anterior y podrían también estar asociadas a la expresión anómala de *Kiss1* en áreas extrahipotalámicas (MeA, BNST y *septum*), entre otras alteraciones.

Es por ello que en esta parte de la Tesis nos propusimos evaluar si la diferenciación sexual del cerebro y el desarrollo de los sistemas de GnRH y *Kiss1* se encuentran alterados en el desarrollo postnatal temprano en ratones GABA_{B1}KO. Seleccionamos ratones de 4 días de edad (DPN4) porque es una edad donde los picos pre (E18) y postnatales de T (DPN1) que inician la diferenciación sexual del cerebro ya han ocurrido pero este proceso está aún en desarrollo (hasta el DPN7, (Kauffman 2010)) y además los efectos activacionales de los estrógenos no se encuentran presentes, dado que el estradiol circulante a esta edad es captado por la α -fetoproteína (Schwarz & McCarthy 2008a).

OBJETIVO III

Estudiar la contribución de los RGABA_B en la organización del eje reproductivo en ratones WT y GABA_{B1}KO a DPN4, evaluando la funcionalidad del eje gonadotrófico.

EXPRESIÓN DE *KISS1* EN HIPOTÁLAMO Y NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS ESPECÍFICOS (SQPCR Y QPCR)

Dados los estudios descriptos en la introducción de este capítulo en dónde mencionamos que *Kiss1* en ARC es un factor involucrado en el correcto desarrollo de los axones de neuronas GnRH y que el correcto desarrollo del eje y la diferenciación sexual durante el periodo neonatal determina el buen funcionamiento del eje en la adultez, decidimos evaluar la expresión de *Kiss1* en el hipotálamo de ratones WT y GABA_{B1}KO de 4 días de edad. Evaluamos su expresión tanto en fragmentos hipotalámicos (HA y HMB) como primera aproximación mediante sqPCR, como en *micropunches* de los núcleos específicos dónde se expresa *Kiss1* (AVPV/PeN y ARC) mediante qPCR. Según resultados obtenidos de bibliografía, hasta el momento, la expresión de *Kiss1* en AVPV/PeN se detectó únicamente a partir de los 10 días de edad en roedores mediante HIS (Semaan *et al.* 2010; Kauffman 2010; Cao & Patisaul 2011; Takumi *et al.* 2011). Sin embargo, no existen registros de expresión de *Kiss1* en AVPV/PeN mediante qPCR antes de esa edad, una técnica más sensible que podría detectar muy bajos niveles de expresión.

KISS1 EN ÁREAS HIPOTALÁMICAS: HA Y HMB (SQPCR)

En primer lugar, evaluamos la expresión de *Kiss1* en los fragmentos hipotalámicos HA y HMB, en dónde se encuentran el AVPV/PeN y ARC respectivamente.

En cuanto a la expresión de *Kiss1* en el HA, la sqPCR nos permitió detectar la expresión de este gen a esta temprana edad, si bien no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 3.1).

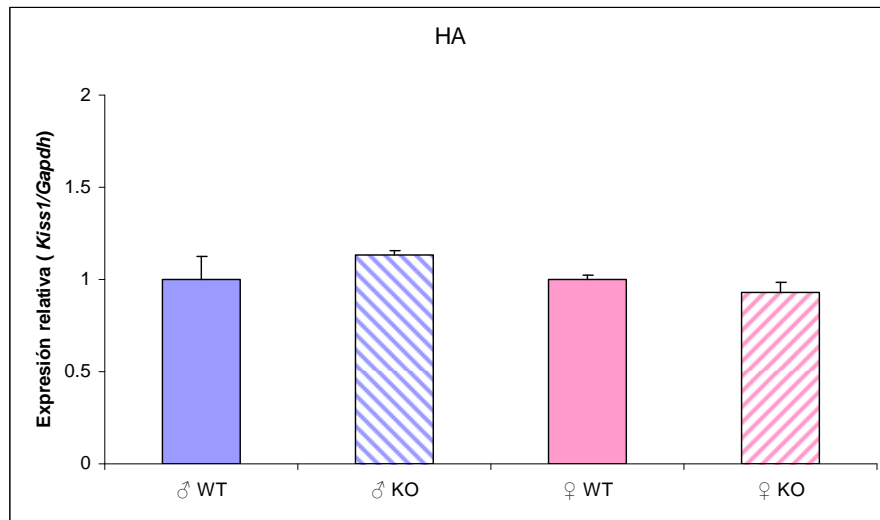


Figura 3.1: Expresión relativa de *Kiss1* (sqPCR) en hipotálamo anterior de ratones DPN4. ANOVA en dos sentidos: NS. N=4-5.

Al analizar la expresión de *Kiss1* en HMB (Figura 3.2) encontramos que ésta depende del sexo y del genotipo y es sexualmente dimórfica en los ratones WT, mayor en las hembras que en machos ($p < 0.01$), como fuera previamente descrito (Poling & Kauffman 2012a). Sin embargo, ésta diferencia sexual se pierde en los ratones GABA_{B1}KO. Además, las hembras GABA_{B1}KO presentan disminuida la expresión de *Kiss1* con respecto a las hembras WT ($p < 0.001$).

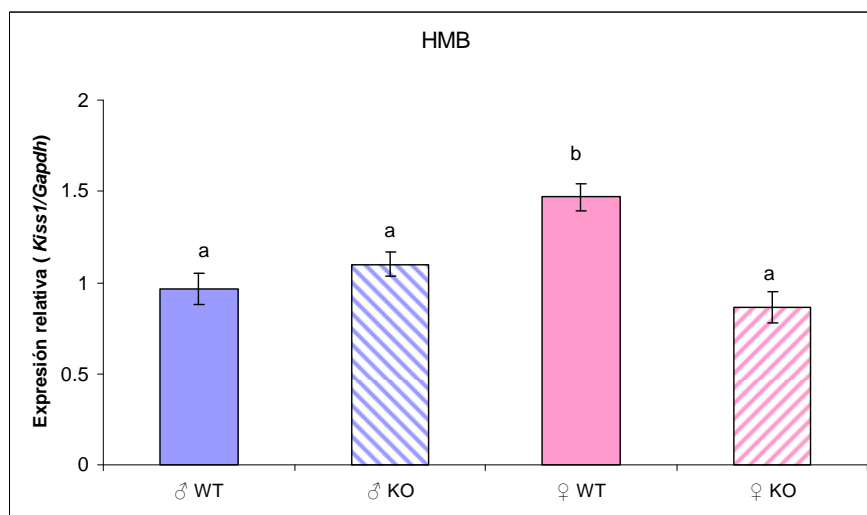


Figura 3.2: Expresión relativa de *Kiss1* (sqPCR) en hipotálamo medio basal de ratones DPN4. ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.001$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). N=5.

Luego evaluamos la expresión de *Kiss1* en *micropunches* de núcleos específicos (AVPV/PeN y ARC) mediante qPCR, una técnica cuantitativa mucho más sensible.

Con esta técnica cuantificamos la expresión de *Kiss1* en el AVPV/PeN y observamos que ésta era sexualmente dimórfica en los ratones WT de 4 días de edad, mayor en machos que en hembras ($p < 0.01$), sin diferencias por genotipo, aunque los niveles detectados fueron muy bajos (Figura 3.3). Estos resultados no concuerdan totalmente con los obtenidos mediante sqPCR, pero creemos que las diferencias se pueden deber a que la qPCR es mucho más sensible que la sqPCR dado que estamos evaluando puntualmente el área de expresión de *Kiss1* (*micropunch* de AVPV/PeN) y su expresión no está diluida en un tejido grande como lo es el HA, que contiene otros núcleos. Esta es la primera evidencia de la expresión sexualmente dimórfica de *Kiss1* en el AVPV/PeN a los 4 días de edad, con mayor expresión en el macho, a diferencia de lo que se observa en la adultez.

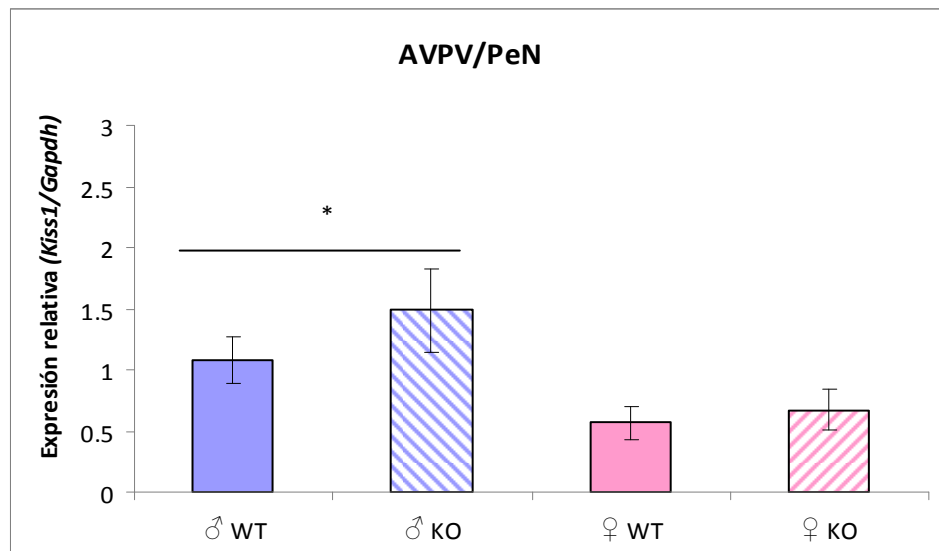


Figura 3.3: Expresión relativa de *Kiss1* (qPCR) en *micropunch* de AVPV/PeN de ratones DPN4. ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.01$, efecto principal genotipo NS. *: *Kiss1* en machos significativamente distinto de *Kiss1* en hembras. N=5-8.

Por otro lado, la expresión de *Kiss1* en el ARC arrojó resultados idénticos a los obtenidos mediante sqPCR y dado que en este caso la precisión de la determinación en el núcleo específico es mayor, la significancia también resultó mayor. Encontramos una diferencia sexual en la expresión de *Kiss1* en el ARC de ratones WT (hembras WT mayor que machos WT, $p < 0.01$), de acuerdo con evidencias previas (Poling & Kauffman 2012a), y ésta se perdió en los ratones $GABA_{B1}KO$, dado que las hembras $GABA_{B1}KO$ presentaron menor expresión con respecto a las hembras WT ($p < 0.01$) (Figura 3.4).

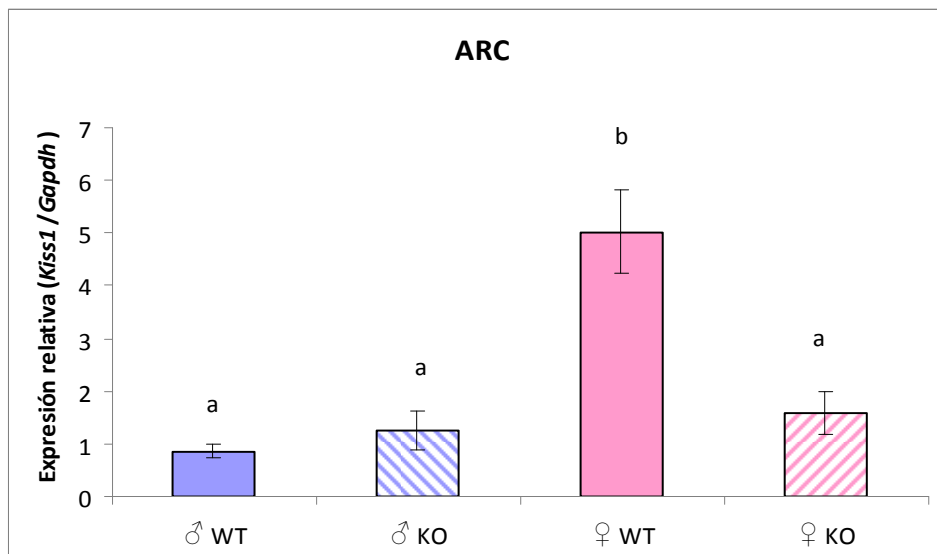


Figura 3.4: Expresión relativa de *Kiss1* (qPCR) en *microarray* de ARC de ratones DPN4. ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). $N = 4-8$.

Luego quisimos evaluar si existen diferencias en la expresión de *Kiss1* a esta edad entre los dos núcleos evaluados (Figura 3.5). Para ello, realizamos una nueva qPCR en la que comparamos la expresión de *Kiss1* entre el AVPV/PeN y ARC en la misma placa. Encontramos que mientras los machos presentan niveles de expresión de *Kiss1* similares entre los núcleos, las hembras expresan significativamente más *Kiss1* en el ARC que en el AVPV/PeN a esta edad ($p < 0.001$). En los machos la estadística no encuentra diferencias significativas, probablemente debido a una sensibilidad menor entre las comparaciones por tener tres factores en juego, aunque existe una tendencia a ser mayor en el ARC. De todos modos la diferencia de expresión entre los núcleos analizados es claramente muy diferente en las hembras.

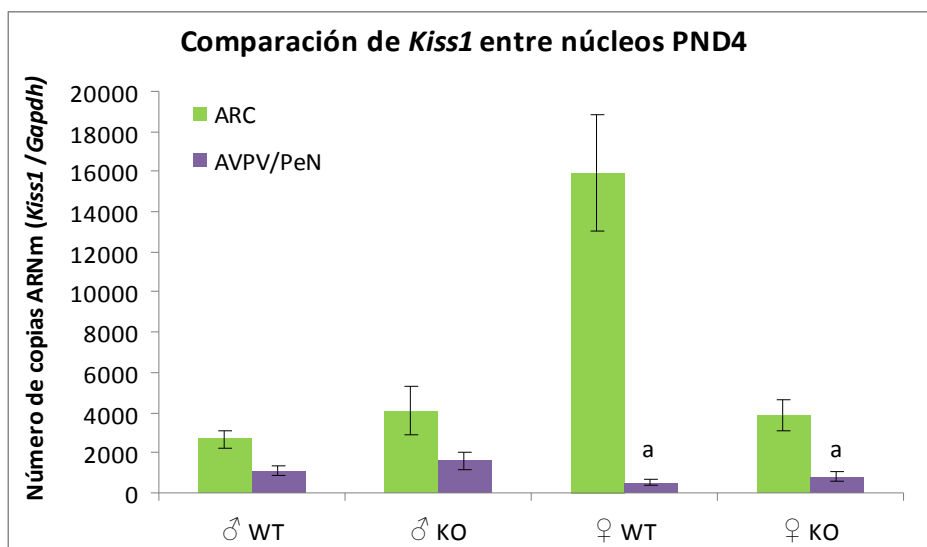


Figura 3.5: Número de copias del ARNm de *Kiss1* (qPCR) en *micropunches* de AVPV/PeN y ARC de ratones DPN4. ANOVA en tres sentidos: interacción triple $p < 0.05$, a: *Kiss1* en ARC de hembras WT y $GABA_{B1}KO$ distinto de *Kiss1* en AVPV/PeN de hembras WT y $GABA_{B1}KO$ $p < 0.001$. $N = 4-8$.

Estos resultados demostrarían que, si bien la expresión de *Kiss1* en ARC es mayor que en el AVPV/PeN a esta edad, la expresión de *Kiss1* en esta última área puede ser cuantificada mediante una técnica sensible como lo es la qPCR y presenta un patrón de expresión diferente al observado en los ratones adultos, y también diferente al ARC a la misma edad. Además, destacamos la importante disminución de la expresión de *Kiss1* en el ARC de hembras $GABA_{B1}KO$ con respecto a las WT a esta edad.

EXPRESIÓN DE *KISS1R* EN HIPOTÁLAMO (QPCR)

Se sabe que kipeptina regula la secreción de GnRH a través de sus receptores (*Kiss1r* o también conocido como GPR54) presentes tanto en el soma (en su mayoría presentes en el APO-HA y algunas dispersas en el HMB) como en los axones de las neuronas de GnRH, los cuales descargan su contenido en la EM. Dado que se ha demostrado que en el SNC *Kiss1* no actúa sólo regulando la reproducción sino que también actúa sobre la regulación metabólica (Castellano *et al.* 2009), también se ha reportado la presencia de *Kiss1r* en otros tipos neuronales como las neuronas nNOS del área preóptica en mamífero (Hanchate *et al.* 2012) y neuronas vasopresinérgicas en el núcleo preóptico de peces (Kanda *et al.* 2013), entre otras.

Aquí nos propusimos evaluar la expresión de *Kiss1r* en HA y HMB de ratones a DPN4 mediante qPCR.

Al analizar la expresión del ARNm del receptor de kisspeptina (*Kiss1r*) en HA (Figura 3.6), observamos que los machos presentan mayores niveles de expresión que las hembras ($p < 0.01$). Por otro lado, los ratones $GABA_{B1}KO$ presentan menor expresión del *Kiss1r* que sus controles WT en esta área ($p < 0.001$).

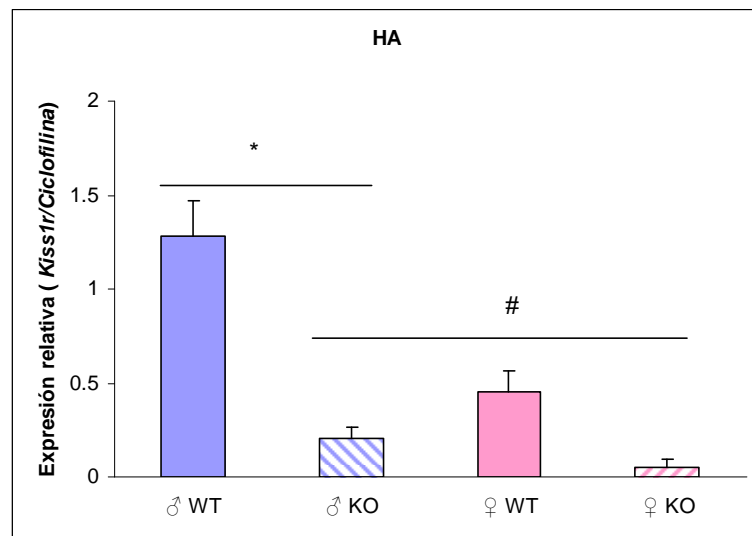


Figura 3.6: Expresión relativa de *Kiss1r* (qPCR) en hipotálamo anterior de ratones a DPN4. ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.01$, efecto principal genotipo $p < 0.001$. *: *Kiss1r* en machos significativamente distinto de *Kiss1r* en hembras. #: *Kiss1r* en ratones $GABA_{B1}KO$ significativamente distinto de *Kiss1r* en ratones WT. N=5.

Por el contrario, en HMB, la expresión de *Kiss1r* se encuentra influida por sexo y genotipo (Figura 3.7). Los ratones WT no presentan diferencias sexuales, sin embargo los machos $GABA_{B1}KO$ presentan niveles mayores de expresión que las hembras $GABA_{B1}KO$ ($p < 0.05$) y estas últimas presentan una disminución muy marcada de *Kiss1r* con respecto a las hembras WT ($p < 0.001$), con valores prácticamente indetectables.

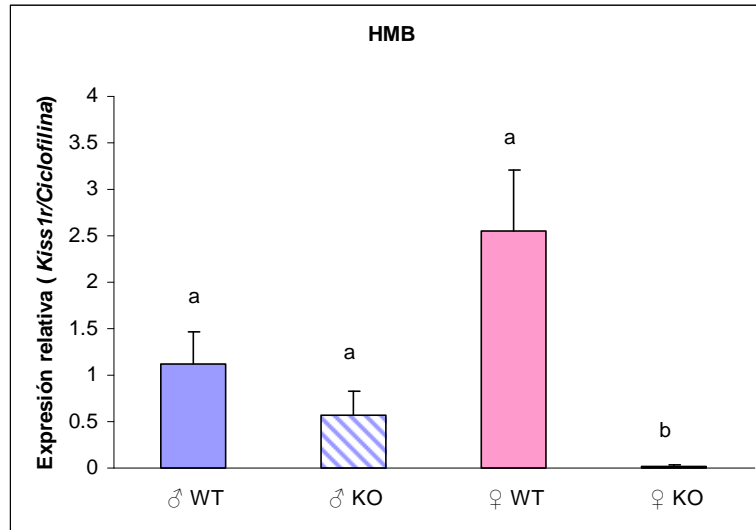


Figura 3.7: Expresión relativa de *Kiss1r* (qPCR) en hipotálamo medio basal de ratones a DPN4. ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.01$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). N=5.

Luego quisimos comparar la expresión relativa entre las dos áreas evaluadas (HA y HMB). Las hembras no presentan diferencias en los niveles de expresión de *Kiss1r* entre áreas. Por el contrario, los machos WT presentan una expresión llamativamente mayor en HA con respecto a HMB ($p < 0.001$), esta diferencia no se observa en los machos $GABA_{B1}KO$ (Figura 3.8).

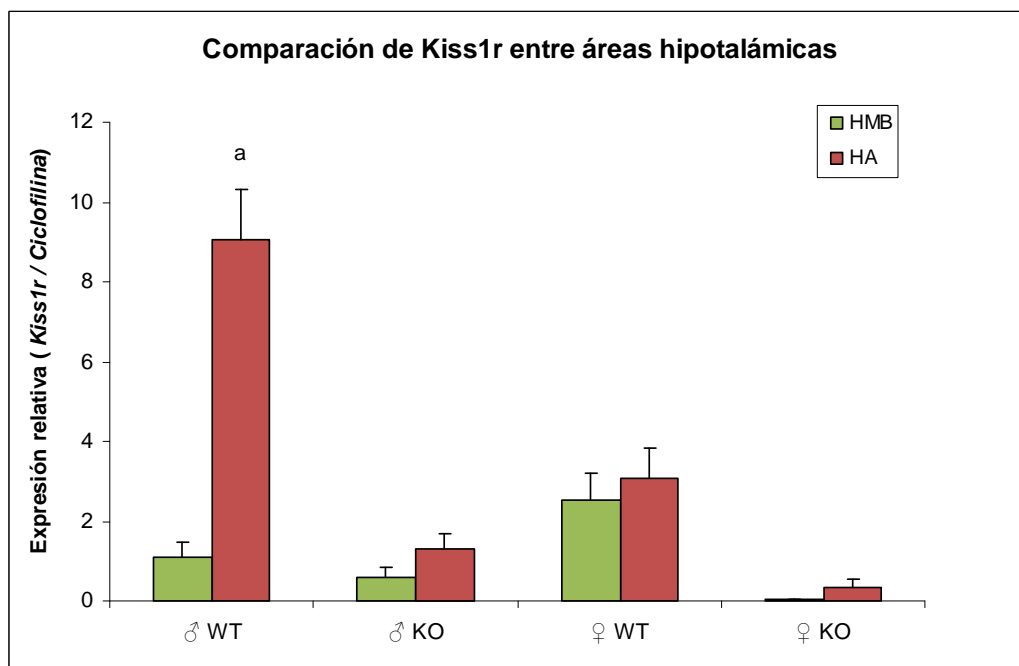


Figura 3.8: Expresión relativa del ARNm de *Kiss1r* (qPCR) en HA y HMB de ratones a DPN4. ANOVA en tres sentidos: interacción triple $p < 0.05$; a: *Kiss1r* en HA de machos WT distinto de *Kiss1r* en HMB de machos WT, $p < 0.001$. N=5.

LOCALIZACIÓN DE NEURONAS GNRH (IHQ)

Dado que los RGABA_B están presentes en neuronas de GnRH desde muy temprano en el desarrollo, para evaluar si las alteraciones observadas en el eje gonadotrófico de ratones adultos podían deberse a una migración anormal o a una alteración en el número de estas neuronas, determinamos, en ambos sexos y genotipos, la localización y el número de neuronas inmunoreactivas para GnRH (ir-GnRH) por IHQ en crías de 4 días de edad (posterior a los dos picos de testosterona que influyen la diferenciación sexual del cerebro y momento en el cual las neuronas de GnRH ya han completado su proceso migratorio (Wierman *et al.* 2004)).

Se analizaron cortes coronales de ratones de DPN4 de ambos sexos y genotipos, desde el BO hasta el APO. A continuación se muestra una serie de fotos representativa (Figura 3.9 A).

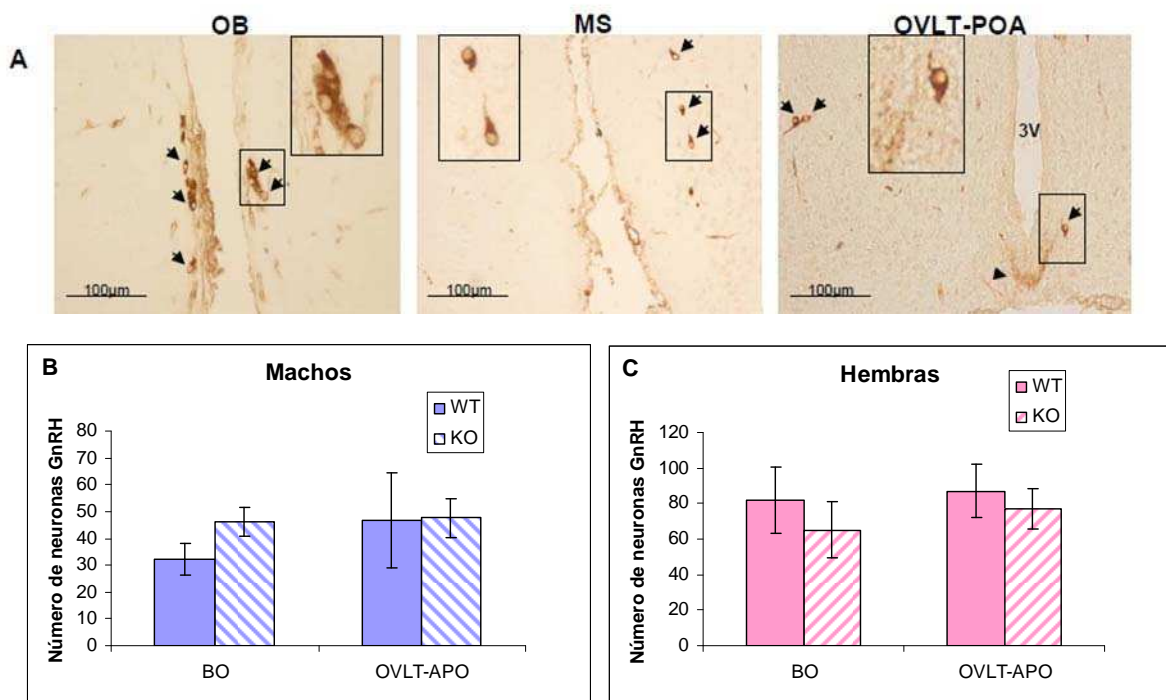


Figura 3.9: A: Microfotografías representativas (20X) de bulbos olfatorios (BO, panel izquierdo), *septum* medial (MS, panel central) y órgano vasculoso de la lámina terminal-área preóptica (OVLT-APO, panel derecho). Las flechas muestran los cuerpos celulares de las neuronas ir-GnRH y las puntas de flecha las fibras inmunoreactivas de GnRH que corren caudalmente, paralelas a la base del cerebro. 3V: tercer ventrículo. Recuadros: ampliación de la zona indicada. N=4. B: Número de neuronas ir-GnRH en OB y OVLT-APO en machos WT y $\text{GABA}_{B1}\text{KO}$ de 4 días de edad. Test t por áreas, efecto genotipo NS. C: Número de neuronas ir-GnRH en OB y OVLT-APO en hembras WT y $\text{GABA}_{B1}\text{KO}$ de 4 días de edad. Test t por áreas, efecto genotipo NS.

No se observaron diferencias significativas entre los genotipos en la distribución o el número de células en el OB u OVLT-APO, ni en machos (Figura 3.9 B) ni hembras (Figura 3.9 C). Se detectaron muy pocos cuerpos neuronales con esta técnica en áreas más caudales, tales como el APO caudal, pero esto no es sorprendente dado que la mayoría de los cuerpos neuronales ir-GnRH se encuentran en regiones más rostrales. Además, se observaron fibras ir-GnRH que corrían caudal y paralelamente al piso del cerebro, las cuáles finalmente convergen en la EM (Figura 3.9 A).

Por lo tanto, podemos concluir que las alteraciones observadas en el eje gonadotrófico de ratones adultos GABA_{B1}KO no se deberían a una migración anormal o a una alteración en el número o localización de estas neuronas.

EXPRESIÓN DE *GNRH1* EN HIPOTÁLAMO (QPCR)

Dado que la localización y el número de las neuronas GnRH no se encontraron alteradas en los ratones GABA_{B1}KO de DPN4, quisimos evaluar si podrían existir diferencias en los niveles de expresión de *Gnrh1* en HA y HMB, así como también en BO y CT (tejido control) en ambos sexos y genotipos, ya que en el Capítulo I de esta Tesis demostramos que la expresión de *Gnrh1* se encontraba alterada en el hipotálamo de ratones adultos GABA_{B1}KO. Además, encontramos diferencias en la expresión de *Kiss1* en el HMB en esta edad, que podría estar regulando la expresión de GnRH.

En el HA la expresión de *Gnrh1* no presentó diferencias significativas entre los grupos (Figura 3.10 izquierda).

Si bien existe controversia sobre este tema, en general se acepta que existen unas pocas neuronas de GnRH dispersas en el HMB. Además, se ha propuesto que existe transporte y regulación axonal de la expresión de *Gnrh1* (Herman & Tomaszewska-Zaremba 2010). Es por eso, que también estudiamos la expresión de *Gnrh1* en el HMB, donde se encuentra la eminencia media, hacia donde convergen los terminales de las neuronas de GnRH.

La expresión de *Gnrh1* en HMB depende del sexo y del genotipo (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$). Similar a lo observado para HA, los ratones hembras y

machos WT no muestran diferencias en los niveles de expresión de *Gnrh1* (Figura 3.10 derecha). Sin embargo, los ratones GABA_{B1}KO presentaron una diferencia sexual en la expresión de *Gnrh1*, siendo ésta mayor en las hembras GABA_{B1}KO que en los machos GABA_{B1}KO ($p < 0.01$).

La expresión del ARNm de *Gnrh1* no mostró diferencias significativas entre los grupos en BO (Figura 3.11 izquierda) o CT (Figura 3.11 derecha).

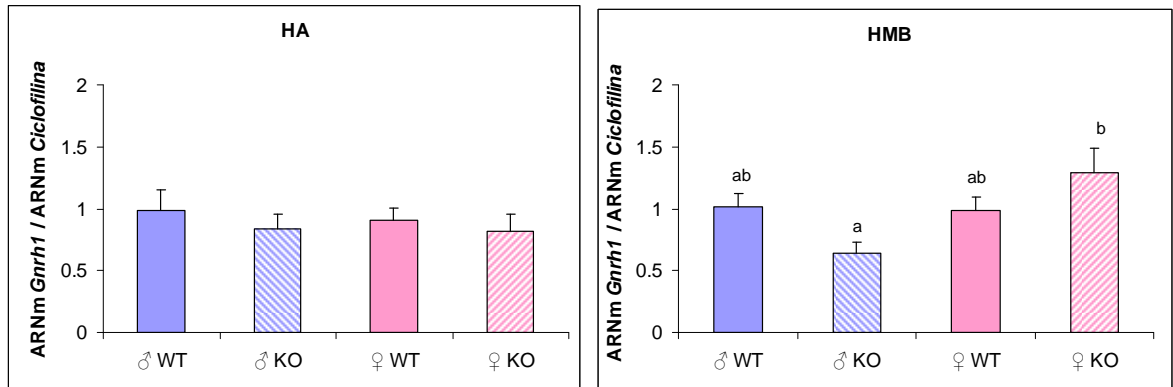


Figura 3.10: Expresión relativa de *Gnrh1* (qPCR) en hipotálamo anterior (HA, panel izquierdo) e hipotálamo medio basal (HMB, panel derecho) de ratones a DPN4. HA: ANOVA en dos sentidos NS. HMB: ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). N=9-10.

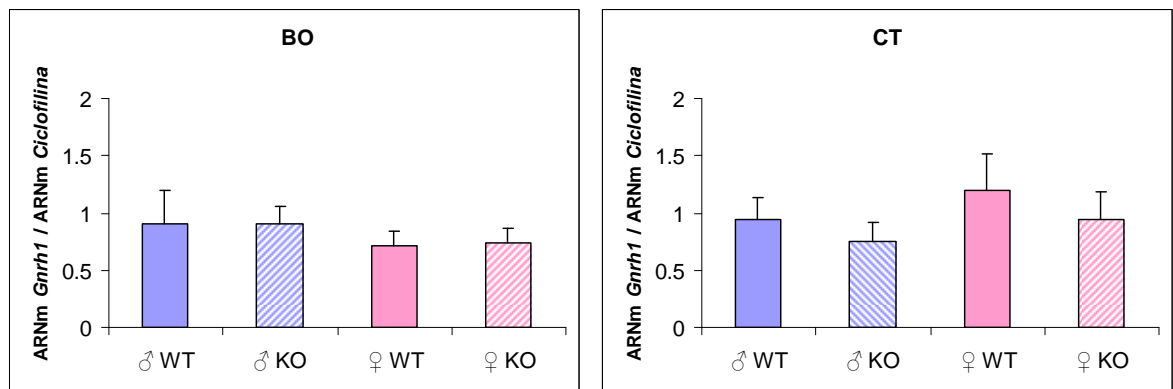


Figura 3.11: Expresión relativa de *Gnrh1* (qPCR) en bulbo olfatorio (BO, panel izquierdo) y corteza frontoparietal (CT, panel derecho) de ratones a DPN4. BO y CT: ANOVA en dos sentidos NS. N=9-10.

Luego quisimos comparar la expresión entre las dos áreas hipotalámicas estudiadas, para lo cual las muestras de cada área se analizaron en la misma placa de qPCR. La expresión de GnRH en HA es mayor que en HMB, como era de esperar, en todos los grupos ($p < 0.0001$) (Figura 3.12).

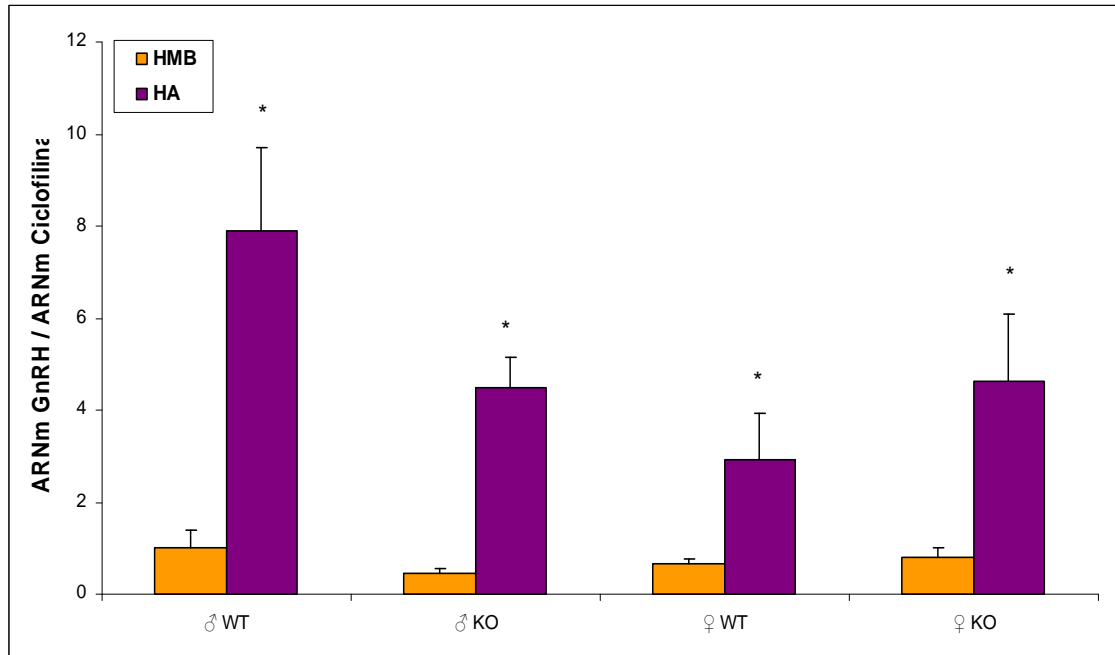


Figura 3.12: Expresión relativa del ARNm de *Gnrh1* (qPCR) en HA y HMB de ratones a DPN4. ANOVA en tres sentidos: interacciones NS, efecto principal área $p < 0.0001$. *: *Gnrh1* en HA distinto de *Gnrh1* en HMB. N=4-6.

Resumiendo, la expresión de *Gnrh1* se vio afectada por el genotipo únicamente en el HMB, en donde apareció una diferencia sexual que no se encontraba presente en los controles WT. Aunque la expresión de *Gnrh1* en esta zona es muchísimo menor que en el HA (como lo mostramos en la Figura 3.12), donde se encuentra la mayoría de los cuerpos neuronales GnRH, a esta edad, los $RGABA_B$ estarían modulando su expresión de manera sexo y área específica, ya sea directa o indirectamente.

CONTENIDO DE GNRH EN HT, BO Y CT (RIA)

Luego de evaluar la expresión de *Gnrh1*, quisimos evaluar el contenido peptídico de GnRH en HA y HMB en ratones a DPN4 de ambos sexos y genotipos.

En el HA, el contenido de GnRH presentó una diferencia sexual en ambos genotipos, los machos presentaron niveles mayores de GnRH con respecto a las hembras ($p < 0.0001$), sin diferencias por genotipo en cada sexo (Figura 3.13 arriba).

En el HMB, sitio en dónde se observa la presencia de los axones que descargan su contenido hacia la EM, el contenido de GnRH fue mayor con respecto al observado en el HA. Además, el contenido de GnRH en el HMB depende del sexo y del genotipo (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$) (Figura 3.13 abajo). En los ratones WT se observó la misma diferencia sexual que en el HA ($p < 0.01$), mientras que esta diferencia se perdió en los ratones $GABA_{B1}KO$.

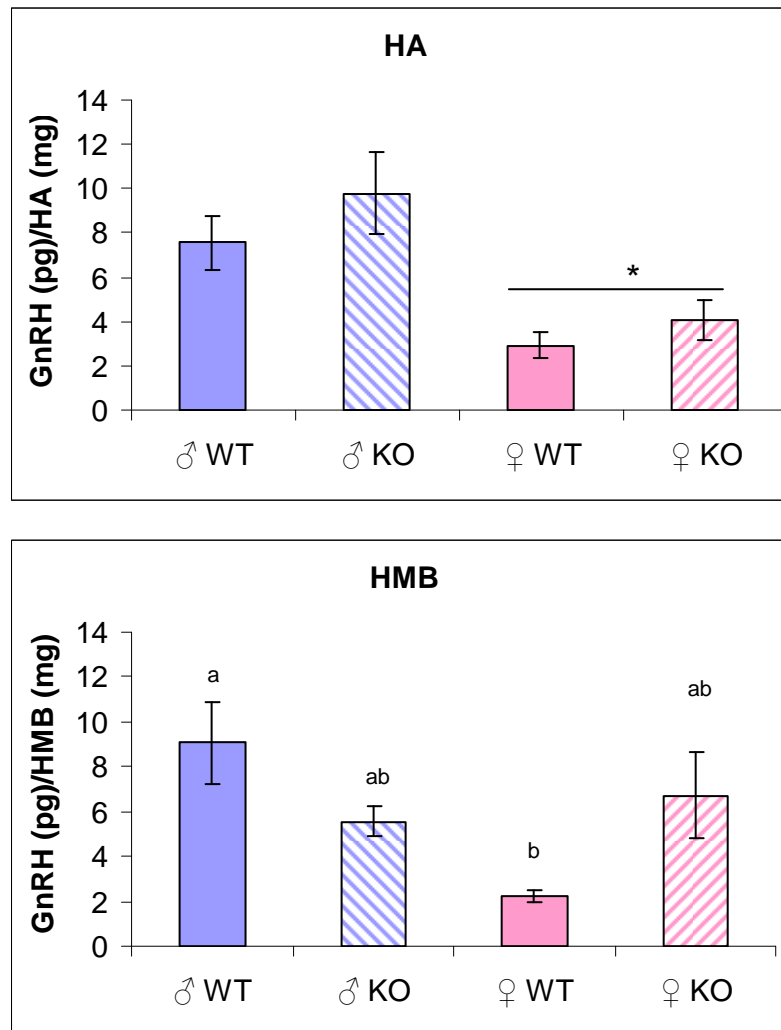


Figura 3.13: Contenido hipotalámico de GnRH (pg totales/mg tejido, RIA) en hipotálamo anterior (HA, arriba) e hipotálamo medio basal (HMB, abajo). HA: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal genotipo NS, efecto principal sexo $p < 0.001$. *: GnRH en hembras distinto de GnRH en machos. HMB: ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.05$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). N=6-13.

También analizamos el contenido de GnRH en el HT entero de ambos sexos y genotipos (Datos no mostrados). El contenido hipotalámico de GnRH mostró un patrón muy similar al obtenido para HMB, sugiriendo una mayor contribución de esta área al

total de GnRH en HT. Además, en HT como en HMB, el contenido de GnRH tuvo una tendencia a aumentar en las hembras $GABA_{B1}KO$ con respecto a las WT, aunque no alcanzó diferencia estadísticamente significativa (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.05$, H WT vs. H KO: $p = 0.11$).

Con respecto al contenido peptídico de GnRH en BO, dónde se encuentra una subpoblación de neuronas GnRH que compartieron un mismo origen con aquellas presentes en el HT, GnRH mostró únicamente diferencia sexual, en los machos mayor que en las hembras ($p < 0.04$), similar a lo observado en HA y en HMB de ratones WT, sin diferencias genotípicas (Figura 3.14 izquierda). En CT, dónde los niveles del péptido son muy bajos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 3.14 derecha).

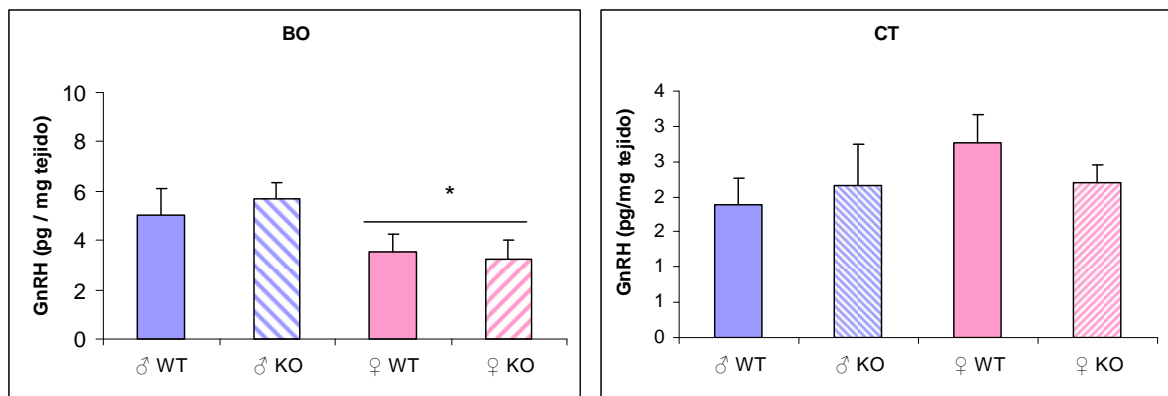


Figura 3.14: Contenido hipotalámico de GnRH (pg/mg tejido, RIA) en bulbo olfatorio (BO, panel izquierdo), corteza frontoparietal (CT, panel derecho). BO: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal genotipo NS, efecto principal sexo $p < 0.04$. *: GnRH en hembras distinto de GnRH en machos. CT: ANOVA en dos sentidos: NS. N=4-8.

EXPRESIÓN DE *GAD1* EN HIPOTÁLAMO (QPCR)

Como mencionamos previamente, GAD_{67} (codificada por el gen *Gad1*) es la principal enzima que convierte glutamato en GABA y este neurotransmisor modula a las neuronas GnRH jugando un rol fundamental en la reproducción. Se ha postulado que GABA es el primer neurotransmisor en ejercer un control regulatorio sobre las neuronas de GnRH durante el desarrollo. En los resultados presentados más arriba, observamos alteraciones tanto a nivel de la expresión como del péptido de GnRH en HT de ratones $GABA_{B1}KO$ a DPN4, las cuales podrían deberse a diferencias en el control GABAérgico. Además, en el Capítulo II demostramos que las neuronas *Kiss1* expresan el $RGABA_{B1}$ en el AVPV y ARC de hembras adultas. Si bien alteraciones en el sistema

GABAérgico no parecieron modificar la expresión de *Kiss1* en dichas áreas en el adulto, no podemos descartar que el GABA podría estar regulando la expresión de *Kiss1* a esta temprana edad. Es por ello que en esta parte analizamos la expresión de *Gad1* en HA y HMB, y también en CT, utilizada como área control, en ratones de 4 días de edad.

En HA se observó únicamente una diferencia sexual, los niveles de *Gad1* en los machos eran mayores que en las hembras ($p < 0.03$), sin diferencias genotípicas (Figura 3.15 izquierda), similar a lo observado para *Gnrh1* en esta área.

Con respecto a la expresión de *Gad1* en HMB, se observó, al igual que para GnRH, que ésta depende del sexo y del genotipo (ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$) (Figura 3.15 derecha). Mientras que los WT no presentan diferencias sexuales, en los GABA_{B1}KO los machos tienen menor expresión de *Gad1* con respecto a las hembras ($p < 0.02$).

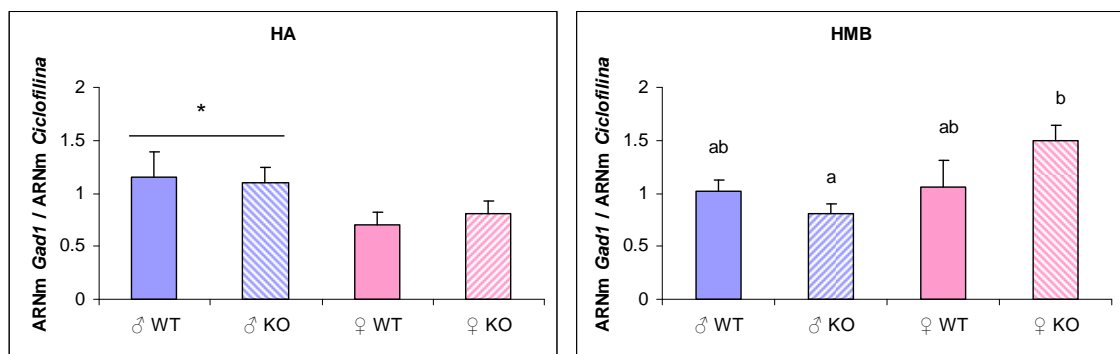


Figura 3.15: Expresión relativa de *Gad1* (qPCR) en hipotálamo anterior (HA, panel izquierdo) e hipotálamo medio basal (HMB, panel derecho) de ratones a DPN4. HA: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.03$; *: *Gad1* en machos distinto de hembras. HMB: ANOVA en dos sentidos: interacción $p < 0.02$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). N=7-10.

Por otro lado, *Gad1* no mostró diferencias significativas entre los grupos en CT (Figura 3.16).

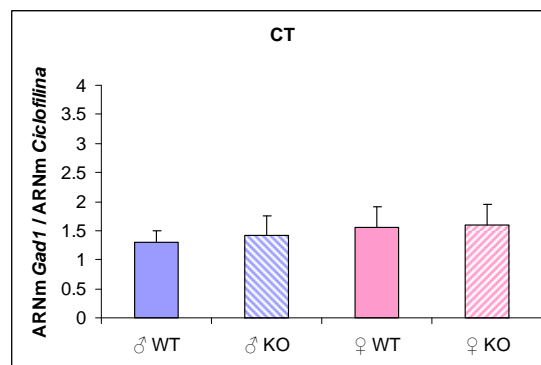


Figura 3.16: Expresión relativa de *Gad1* (qPCR) en corteza frontoparietal (CT). ANOVA en dos sentidos: NS. N=6-9.

Luego quisimos comparar la expresión de *Gad1* entre las dos áreas hipotalámicas estudiadas (Figura 3.17), comparando las muestras pertenecientes a cada área en la misma placa de qPCR. La expresión de *Gad1* en machos fue tres veces mayor en HA con respecto a HMB ($p < 0.05$), mientras la expresión entre áreas fue similar en hembras.

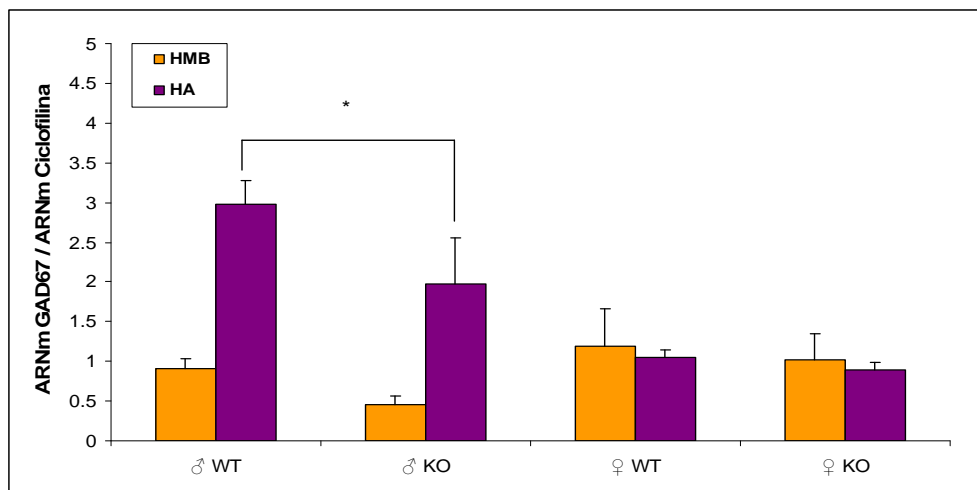


Figura 3.17: Expresión relativa del ARNm de *Gad1* (qPCR) en HA y HMB de ratones a DPN4. ANOVA en tres sentidos: interacción triple NS, interacción tejido-sexo: $p < 0.01$, *: HA macho distinto HMB de macho $p < 0.05$. $N = 4-6$.

Por lo tanto, al igual que para la expresión de *Gnrh1*, la expresión de *Gad1* mostró un patrón alterado en los animales $GABA_{B1}KO$ únicamente el HMB. Además, encontramos que la expresión de *Gad1* era mayor en el HA que en el HMB de machos, pero era similar entre áreas en hembras, lo que postula diferentes mecanismos regulatorios en cada sexo. Nuevamente, si bien el HMB no es el que aporta la mayor expresión de *Gad1*, a esta edad jugaría un rol importante en el eje gonadotrófico, probablemente actuando sobre las neuronas GnRH, y estaría regulado por los $RGABA_B$ de manera sexo y área específica.

CORRELACIÓN ENTRE *GNRH1* Y *GAD1* (QPCR)

Dado que los patrones de expresión de *Gnrh1* y *Gad1* fueron muy similares en el HMB, decidimos evaluar una posible correlación entre la expresión de ambos genes en las dos áreas hipotalámicas evaluadas.

Efectivamente, *Gnrh1* y *Gad1* presentan una asociación lineal positiva o directa en HMB (Coeficiente de correlación de Pearson= $r = 0.53$; $p < 0.01$). Sin embargo dicha asociación lineal no se observó en HA ($p = 0.15$) (Figura 3.18).

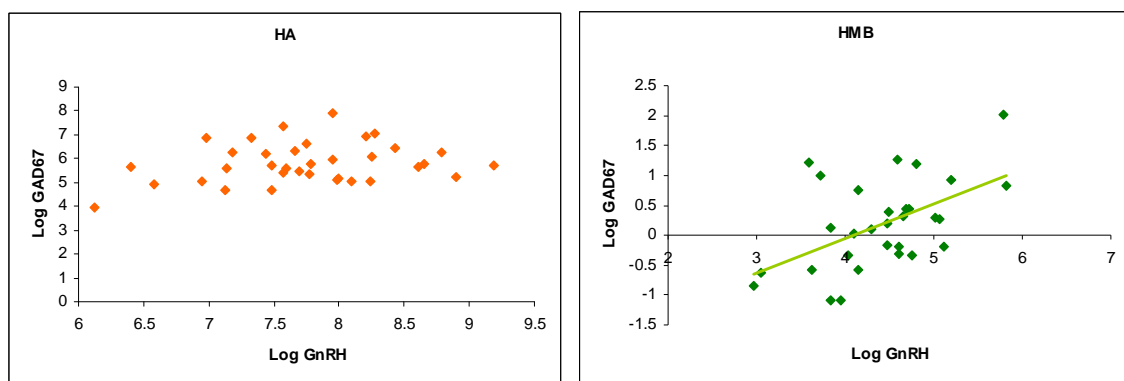


Figura 3.18: Gráficos de dispersión para evaluar correlación entre *Gad1* y *Gnrh1* en HA (izquierda) y HMB (derecha) de ratones a DPN4. HA: Coeficiente de correlación de Pearson NS. HMB: Coeficiente de correlación de Pearson= $r = 0.53$; $p < 0.01$

Estos resultados indicarían que la expresión de estos dos genes está asociada únicamente en el HMB a esta edad. Si bien existe una correlación positiva no podemos afirmar la dirección de dicha correlación, es decir, ambos genes varían su expresión de igual manera entre los grupos. Todo apuntaría a pensar que la expresión de *Gad1* aumenta por la falta del $RGABA_B$ y a través del aumento de GABA induciría la expresión de *Gnrh1*, aunque no podemos descartar que la falta del $RGABA_B$ afecte a las dos poblaciones neuronales en forma similar.

CORRELACIÓN ENTRE *GNRH1* Y *GAD1* CON *KISS1* EN HMB (QPCR)

La expresión de *Gnrh1* y *Gad1* en HMB presentó un patrón inverso con respecto a la expresión de *Kiss1* en HMB (sqPCR). Mientras que en los GABA_{B1}KO la expresión de *Gnrh1* y *Gad1* presentaba una diferencia sexual (hembras mayor a machos) ausente en los WT, la expresión de *Kiss1* los ratones GABA_{B1}KO perdía la diferencia sexual presente en los WT (hembras mayor a machos). Es por ello que decidimos evaluar si existía una correlación negativa entre la expresión de *Gnrh1* o *Gad1* con *Kiss1* en HMB.

Sin embargo, los resultados de estos análisis de correlación demostraron que no existen evidencias para afirmar dicha correlación (*Gnrh1-Kiss1*: $p = 0.55$; *Gad1-Kiss1*: $p = 0.54$) (Figura 3.19).

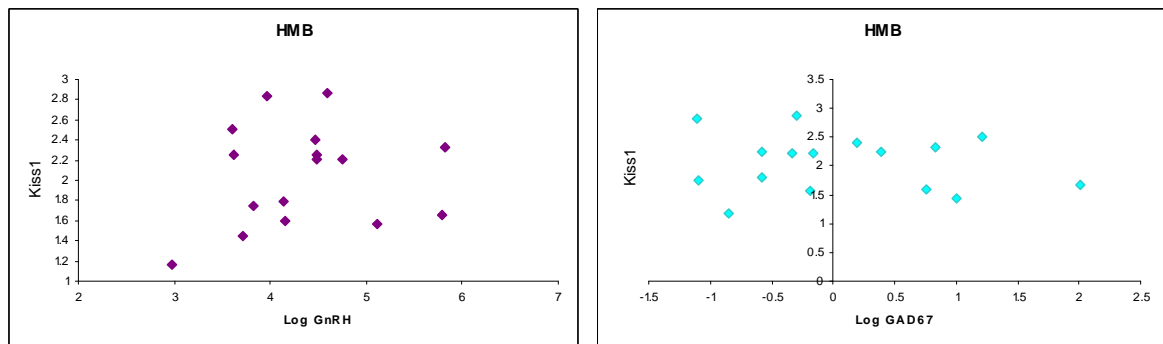


Figura 3.19: Gráficos de dispersión para evaluar correlación entre *Kiss1* y *Gnrh1* (izquierda) o *Gad1* (derecha) en HMB de ratones a DPN4. Coeficiente de correlación de Pearson NS.

Es decir que a esta edad *Gnrh1* y *Gad1* no presentan una asociación lineal con *Kiss1*, pero sí entre ellos. Esto da lugar a pensar que a esta edad, las alteraciones observadas en *Kiss1* en el ARC de ratones GABA_{B1}KO no dan lugar a las observadas en *Gnrh1* y *Gad1* en el HMB.

CONTENIDO DE GABA, GLUTAMATO Y TAURINA EN HT Y CT (HPLC)

En los resultados presentados anteriormente determinamos que *Gnrh1* y *Gad1* presentan una asociación lineal positiva. Es por ello que decidimos evaluar si las diferencias encontradas en el contenido hipotalámico de GnRH podrían deberse a

alteraciones de los principales aminoácidos excitatorios e inhibitorios relacionados con el sistema GABAérgico. Determinamos mediante la técnica de HPLC los contenidos de GABA, glutamato y taurina. Esto lo realizamos tanto en HT como en CT (tejido control) de ratones de ambos sexos y genotipos de 4 días de edad.

GABA mostró una diferencia sexual en HT, siendo el contenido en machos mayor que hembras ($p < 0.05$), y sin diferencias entre genotipos (Tabla 3.1). No se observaron diferencias en el contenido de GABA en CT ni en el contenido de glutamato y taurina en HT y CT (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Contenido de los neurotransmisores GABA, glutamato y taurina (nmoles/mg tejido) en hipotálamo (HT) y corteza frontoparietal (CT) de ratones a DPN4 (HPLC). GABA en HT: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.05$. a: GABA en HT de machos distinto de GABA en HT de hembras. N=5-8.

HT	♂ WT	♂ KO	♀ WT	♀ KO
GABA (nmol/mg tejido)	3.86 ± 0.26 a	3.96 ± 0.23 a	3.55 ± 0.14	3.35 ± 0.27
Glutamato (nm/mg tejido)	10.57 ± 0.72	11.28 ± 1.16	10.16 ± 0.50	8.79 ± 0.65
Taurina (nm/mg tejido)	25.89 ± 1.51	26.34 ± 1.47	24.06 ± 0.83	24.72 ± 2.00
CT	♂ WT	♂ KO	♀ WT	♀ KO
GABA (nmol/mg tejido)	0.60 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.58 ± 0.07	0.60 ± 0.08
Glutamato (nm/mg tejido)	6.16 ± 0.24	6.60 ± 0.60	6.29 ± 0.58	5.81 ± 0.67
Taurina (nm/mg tejido)	22.08 ± 0.94	23.19 ± 1.89	21.55 ± 1.71	21.35 ± 1.69

Estos resultados indicarían que el contenido hipotalámico de GABA estaría fundamentalmente aportado por el HA, dónde se observó la mayor expresión de *Gad1*, dado que ambos muestran la misma diferencia sexual (machos mayor que hembras). Además, tanto el contenido de GABA como el de GnRH es mayor en machos WT con respecto a hembras WT, sugiriendo que el GABA ejercería un efecto estimulatorio a esta edad.

Con estos resultados no podemos descartar que el contenido de GABA en el HMB sea diferente del observado en el HT total, que esté regulado por la expresión local de *Gad1* y esté también controlando la expresión *Gnrh1* en esta área.

Luego quisimos evaluar si las alteraciones encontradas tanto en *Gnrh1*/GnRH como en *Gad1* y *Kiss1* en ratones GABA_{B1}KO de 4 días de edad podían deberse a variaciones en la síntesis y/o sensibilidad al E₂ por parte de estas neuronas o de neuronas que las regulan y se sabe que responden a E₂. Para ello evaluamos la expresión de *Cyp19a1* (aromatasa: enzima que convierte testosterona a estradiol en los tejidos blanco) en ratones de ambos sexos y genotipos de DPN4.

En HA encontramos que la expresión de *Cyp19a1* era similar en ambos sexos, sin embargo los ratones GABA_{B1}KO presentaron aumentada la expresión de *Cyp19a1* con respecto a los WT ($p < 0.05$) (Figura 3.20 izquierda). Por lo que un aumento en la síntesis local de E₂ podría verse favorecido en estos animales.

A diferencia del HA, en HMB no se encontraron diferencias en la expresión de *Cyp19a1* entre los grupos (Figura 3.20 derecha).

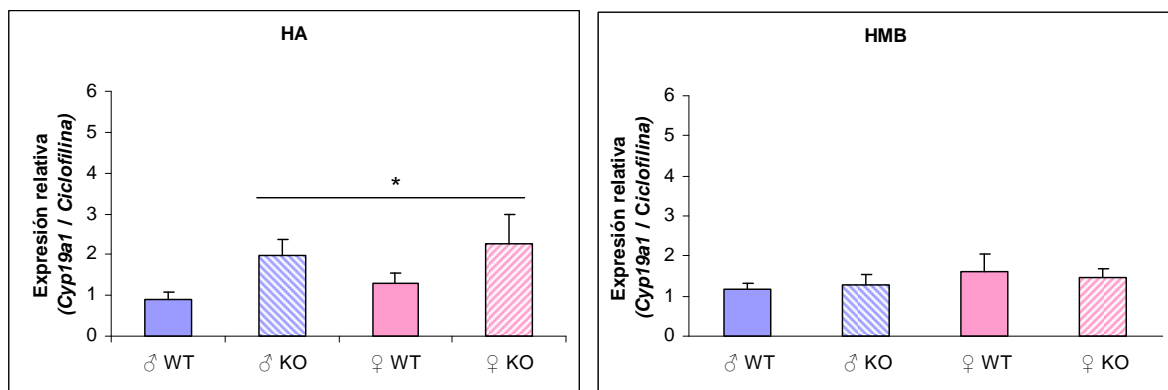


Figura 3.20: Expresión relativa de *Cyp19a1* (qPCR) en hipotálamo anterior (HA, panel izquierdo) e hipotálamo medio basal (HMB, panel derecho) de ratones a DPN4. HA: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal genotipo $p < 0.05$; *: *Cyp19a1* en ratones GABA_{B1}KO distinto de ratones WT. HMB: ANOVA en dos sentidos: NS. N=8-10.

Si bien encontramos que en HA existe mayor expresión de *Cyp19a1* en los ratones GABA_{B1}KO, no podemos afirmar que la enzima o su actividad sea mayor en estos ratones con respecto a los WT, ni que esta pequeña diferencia en su expresión tenga alguna relevancia fisiológica. Además podemos destacar que la expresión del ARNm de esta enzima resultó afectada en el HA, a diferencia de lo observado para *Gnrh1* y *Gad1* en donde las diferencias genotípicas se observaron en HMB, lo cual indicaría que la

falta del RGABA_B a esta edad no afecta de la misma manera la expresión de todos los genes.

EXPRESIÓN DE *Pgr* EN NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS ESPECÍFICOS AVPV/PEN Y ARC (QPCR)

Dado que habíamos observado una disminución de la expresión de *Kiss1* en el ARC de hembras $\text{GABA}_{B1}\text{KO}$ y que esto podía deberse a un efecto inhibitorio de los estrógenos (dado que a esta edad la retroalimentación negativa ya se encuentra activa), además de medir la expresión de *Cyp19a1* decidimos evaluar la expresión del receptor de progesterona (*Pgr*). El *Pgr* es un gen sensible a la regulación por estradiol y se lo utiliza como marcador de los niveles de estradiol circulantes.

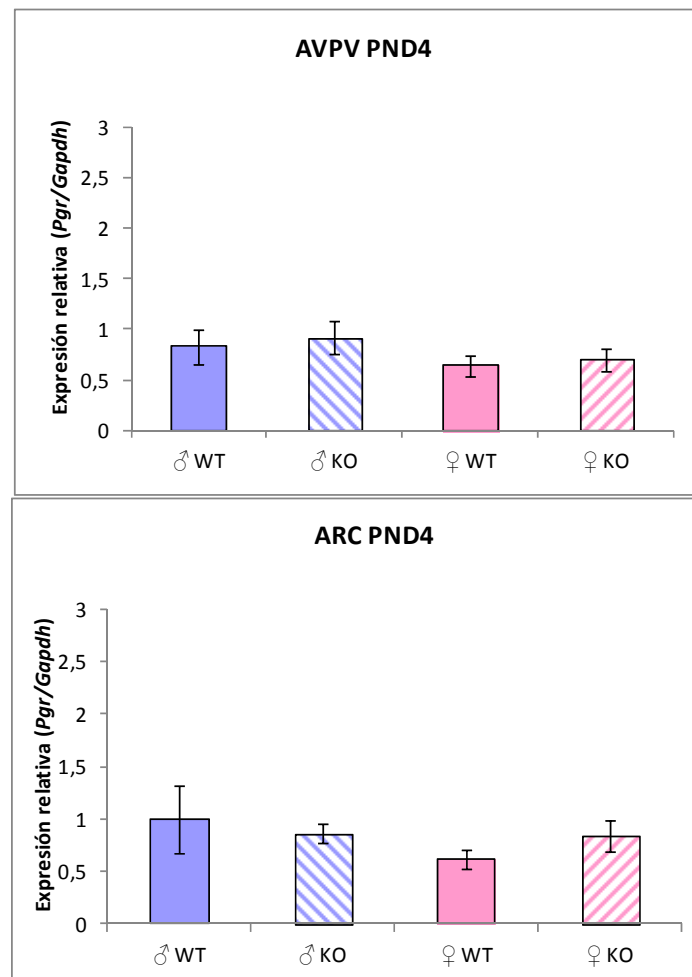


Figura 3.21: Expresión relativa de *Pgr* (qPCR) en *micropunches* de núcleos hipotalámicos específicos: AVPV/PeN (arriba) y ARC (abajo) de ratones DPN4. AVPV/PeN y ARC: ANOVA en dos sentidos: NS. N=5-10.

Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de *Pgr* entre los grupos ni en el AVPV/PeN ni en el ARC de ratones de 4 días de edad (Figura 3.21). En el AVPV/PeN observamos una tendencia a una mayor expresión de *Pgr* en machos, como ha sido sugerido en la bibliografía (Quadros *et al.* 2002b).

Por lo tanto, dado que la expresión de *Pgr*, que es sensible a los niveles de estradiol circulante, no mostró diferencias en el ARC, las diferencias observadas en la expresión de *Kiss1* en esta área probablemente no se deberían a diferencias en el nivel de los esteroides entre los genotipos, sino más bien sería la consecuencia de la falta del receptor GABA_B, por alteración en la sensibilidad a estrógenos de esta población neuronal de *Kiss1* o la combinación de estos factores.

EXPRESIÓN DE *TH* EN NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS ESPECÍFICOS AVPV/PEN Y ARC (QPCR)

La tirosina hidroxilasa (TH), como mencionáramos en el Capítulo I, es la enzima limitante en la síntesis de dopamina, quien controla negativamente la síntesis y secreción de prolactina (PRL). La expresión de *Th* está sexualmente diferenciada en AVPV/PeN de ratones adultos, siendo mayor en hembras que en machos, similar a lo que se observa para *Kiss1* (Semaan *et al.* 2010). La mayoría de las neuronas *Kiss1* co-expresan *Th*, especialmente en PeN (Semaan *et al.* 2010). Por lo tanto, decidimos evaluar la expresión de *Th* para determinar si las alteraciones observadas para *Kiss1*, *Gnrh1* y *Gad1* en los ratones GABA_{B1}KO son exclusivas de estos genes o si la falta del receptor afecta también a otros genes sexualmente dimórficos.

No encontramos diferencias entre los grupos ni en AVPV/PeN ni en ARC en la expresión de *Th* a los 4 días de edad (Figura 3.22), indicando que las diferencias sexuales observadas en la adultez se instalan más adelante durante el desarrollo.

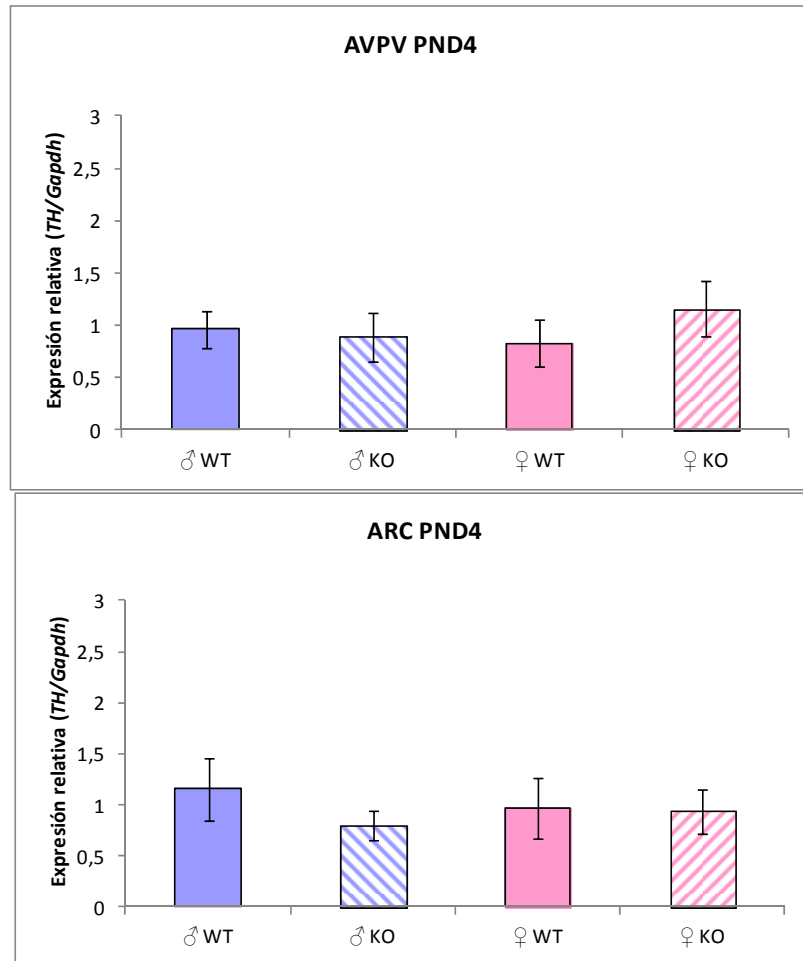


Figura 3.22: Expresión relativa de *Th* (qPCR) en *multipunches* de núcleos hipotalámicos específicos: AVPV/PeN (arriba) y ARC (abajo) de ratones a DPN4. AVPV/PeN y ARC: ANOVA en dos sentidos: NS. N=5-10.

Cuando comparamos la expresión de *Th* en los dos núcleos específicos encontramos que la expresión es mayor en el ARC comparado con el AVPV/PeN ($p < 0.0001$) (Figura 3.23).

Por lo tanto, podemos decir que las diferencias genotípicas encontradas en la expresión de *Kiss1*, *Gnrh1* y *Gad1* debido a la falta de un RGABA_B funcional son específicas de determinados genes y no afecta en general a todos los genes sexualmente dimórficos.

Además, dado que el E_2 estimula la expresión de *Th* (Pau *et al.* 2000; Serova *et al.* 2002), estos resultados y los obtenidos para el *Pgr*, llevarían a pensar que el E_2 circulante no se encontraría afectado en los ratones $\text{GABA}_{B1}\text{KO}$ a DPN4.

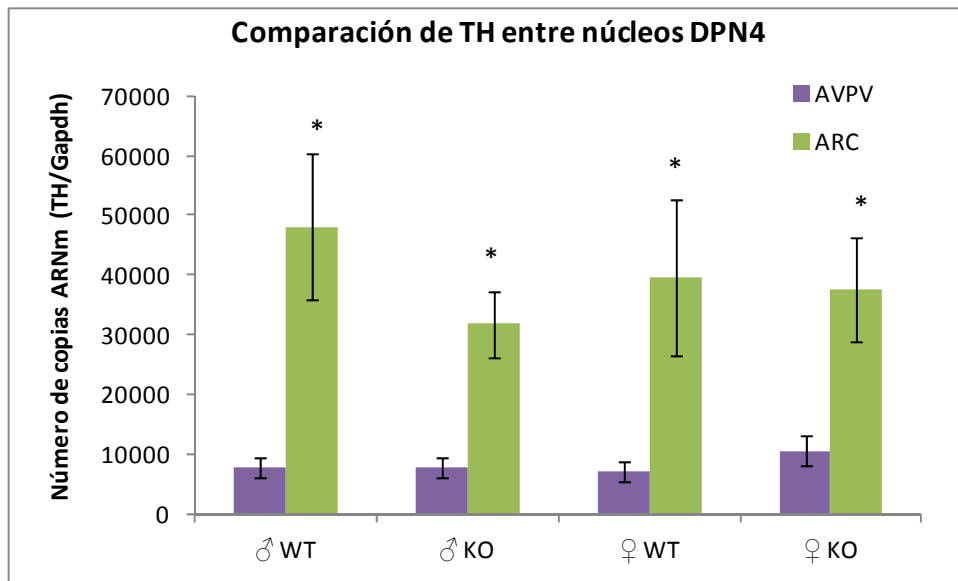


Figura 3.23: Número de copias del ARNm de *Th* (qPCR) en *micropunches* de AVPV/PeN y ARC de ratones a DPN4. ANOVA en tres sentidos: interacción triple NS, efecto principal área $p < 0.0001$.

*: *Th* en ARC distinto de *Th* en AVPV/PeN. N=5-10

RESULTADOS III B. EJE GONADOTRÓFICO: HIPÓFISIS

EXPRESIÓN DEL *GNRH1R* (QPCR)

Dado que en las hembras $GABA_{B1}KO$ de 4 días de edad observamos una tendencia a aumentar su contenido HT de GnRH y que los patrones de secreción de GnRH regulan la expresión del receptor de GnRH (RGnRH) en la hipófisis, quisimos evaluar si existía alguna alteración en estos ratones a nivel de la expresión del ARNm del RGnRH (*Gnrh1r*) en adenohipófisis.

Cuando analizamos la expresión del *Gnrh1r* observamos una diferencia sexual, los machos presentaron mayor expresión que las hembras ($p < 0.04$), sin encontrarse diferencias genotípicas (Figura 3.24). Esta misma diferencia sexual había sido descrita anteriormente en ratas prepúberes por ensayos de unión al receptor (*binding*) (Lacau-Mengido *et al.* 1998). Estos resultados sugerirían que las posibles diferencias en la secreción de GnRH a esta edad no estarían modificando la expresión del *Gnrh1r*.

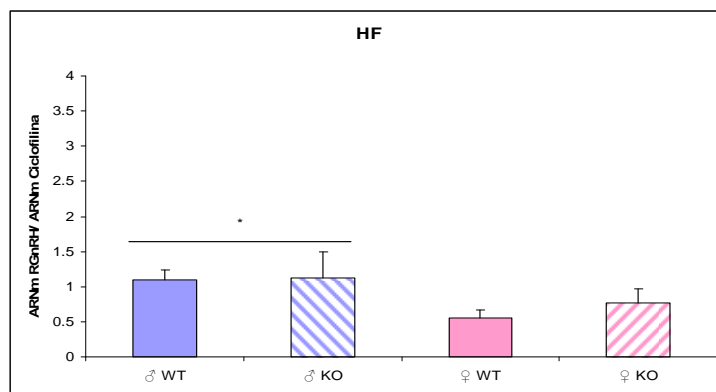


Figura 3.24: Expresión relativa de *Gnrh1r* (qPCR) en adenohipófisis de ratones a DPN4. ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.04$. *: *Gnrh1r* en HF de machos distinto de *Gnrh1r* en HF de hembras. N=5-10.

CONTENIDO Y NIVELES SÉRICOS DE LH, FSH Y PRL (RIA)

Dado que cambios en GnRH pueden también llevar a cambios en la síntesis y secreción de gonadotropinas, estudiamos a continuación estos parámetros en nuestro modelo experimental a los 4 días de edad.

El contenido hipofisario de LH depende del sexo y del genotipo (ANOVA en dos sentidos, interacción: $p < 0.05$) (Figura 3.25 izquierda). Si bien no se encontraron diferencias significativas a esta edad en los ratones WT, el contenido de LH se encontró aumentado en las hembras $GABA_{B1}KO$ con respecto a las hembras WT ($p < 0.05$) y también marginalmente ($p = 0.06$) con respecto a los machos $GABA_{B1}KO$.

En cuanto a los niveles séricos de LH (Figura 3.25 derecha), se observó que las hembras presentan niveles mayores con respecto a los machos ($p < 0.05$) y que los ratones $GABA_{B1}KO$ presentaron niveles mayores con respecto a los WT ($p < 0.05$).

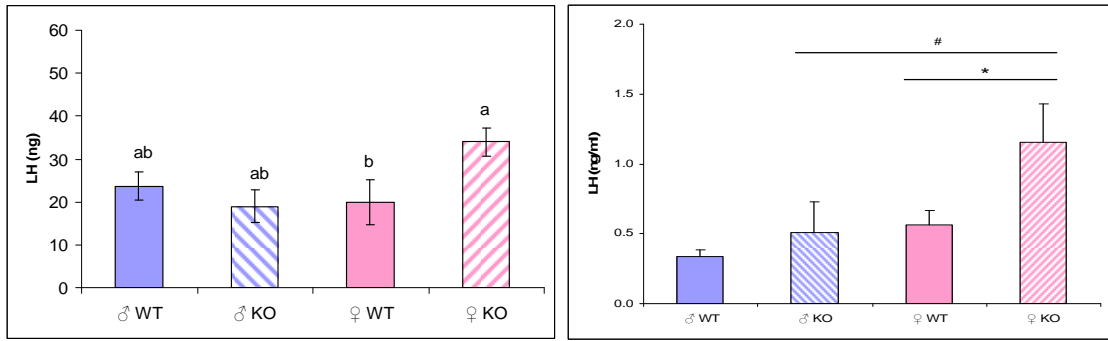


Figura 3.25: Contenido (ng totales/HF, izquierda) y niveles séricos (ng/ml, derecha) de LH (RIA) en ratones a DPN4. Contenido de LH: ANOVA en dos sentidos, interacción $p < 0.05$. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Niveles séricos de LH: ANOVA en dos sentidos, interacción NS, efectos principales sexo y genotipo $p < 0.05$. *: LH sérica en hembras distinta de LH sérica en machos. #: LH sérica en ratones WT distinta de LH sérica en ratones $GABA_{B1}KO$. N=5-9.

El contenido hipofisario de FSH no mostró diferencias significativas entre los grupos a esta edad (Figura 3.26 izquierda). Sin embargo, los niveles séricos de FSH fueron mayores en hembras con respecto a los machos ($p < 0.001$), de acuerdo con estudios previos (Dohler & Wuttke 1975), sin diferencias genotípicas (Figura 3.26 derecha).

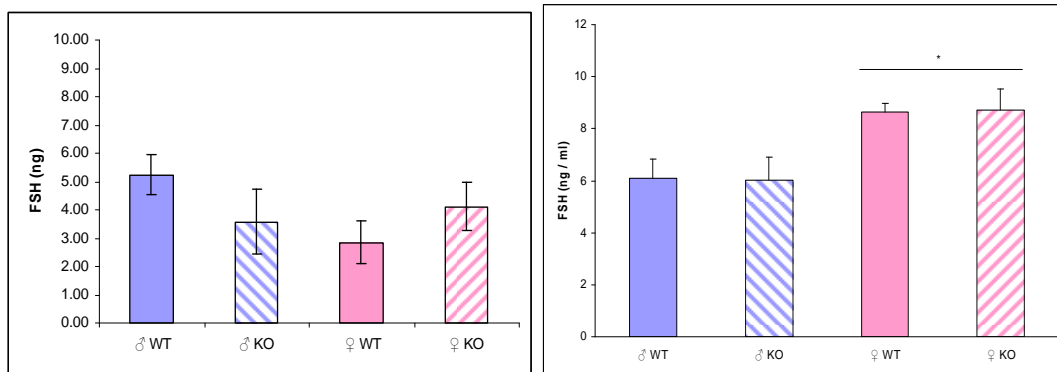


Figura 3.26: Contenido (ng totales/HF, izquierda) y niveles séricos (ng/ml, derecha) de FSH (RIA) en ratones a DPN4. Contenido de FSH: ANOVA en dos sentidos NS. Niveles séricos de FSH: ANOVA en dos sentidos, interacción NS, efecto principal sexo $p < 0.001$. *: FSH sérica en hembras distinta de FSH sérica en machos. N=4-11.

Por otro lado también evaluamos los niveles séricos de prolactina (PRL) dado que es una hormona relacionada con el eje gonadotrófico. Tanto la proliferación de las células hipofisarias secretoras de PRL, los lactotropos, como su secreción, están reguladas positivamente por E_2 .

No encontramos diferencias significativas en los niveles de prolactina sérica entre los grupos a esta edad (Figura 3.27). Este resultado era esperable ya que no se

evidenciaron diferencias en la expresión de la enzima limitante en la síntesis de dopamina (*Th*), principal regulador negativo de PRL. Este resultado sería también un indicio de que los niveles de E₂ circulante no se encontrarían afectados en los ratones GABA_{B1}KO de 4 días de edad.

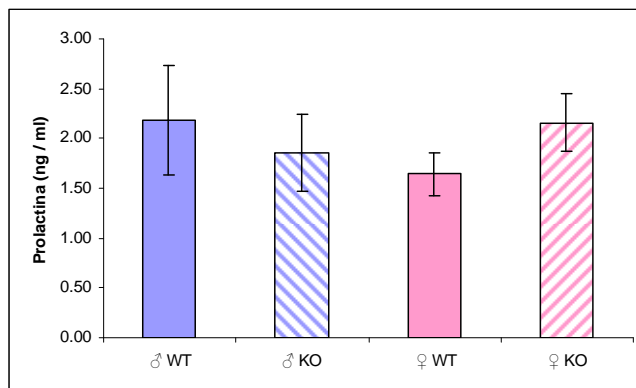


Figura 3.27: Niveles séricos (ng/ml, derecha) de PRL (RIA) en ratones a DPN4. ANOVA en dos sentidos NS. N=5-9.

RESULTADOS III C. EJE GONADOTRÓFICO: GÓNADAS

EXPRESIÓN DE AROMATASA GONADAL (QPCR)

Aunque el estímulo natural de la síntesis de aromatasa es FSH, se ha postulado que LH puede inducir la síntesis y actividad de aromatasa, especialmente cuando los receptores de LH están presentes en niveles bajos (Andric & Ascoli 2008). En los resultados presentados anteriormente demostramos que tanto el contenido hipofisario como los niveles séricos de LH se encontraban alterados en los ratones GABA_{B1}KO. Es por ello que decidimos evaluar la expresión de *Cyp19a1* en las gónadas de ratones WT y GABA_{B1}KO a esta edad.

Los ovarios de hembras de ambos genotipos no difieren en la expresión de *Cyp19a1* (Test t ns) (Figura 3.28 izquierda). Sin embargo, la expresión de *Cyp19a1* es mayor en los testículos de machos GABA_{B1}KO con respecto a los WT ($p < 0.001$) (Figura 3.28 derecha). Cabe aclarar, que los niveles de expresión gonadal de *Cyp19a1* en machos fueron muchísimo más bajos que en las hembras, dado que para los testículos se utilizó una RT de 3 μ g/20 μ l para levantar el producto, mientras que fue de 1 μ g/20 μ l para los ovarios.

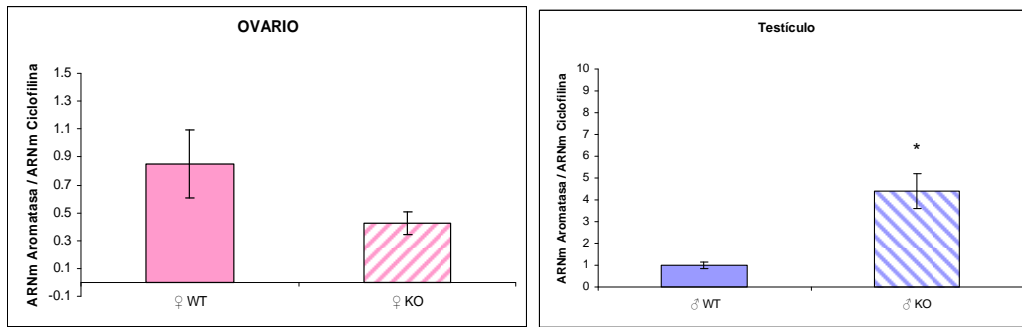


Figura 3.28: Expresión relativa de *Cyp19a1* (qPCR) en ovario (izquierda) y testículo (derecha) de ratones a DPN4. Ovario: Test t NS. Testículo: Test t $p < 0.001$. *: *Cyp19a1* en machos GABA_{B1}KO distinto de *Cyp19a1* en machos WT. N=5-8

Si bien la expresión de la enzima no necesariamente equivale a una modificación a nivel de la expresión de la proteína o su actividad enzimática, éste es un primer indicio que nos lleva a pensar que las alteraciones a nivel hipofisario y/o la ausencia del RGABA_B en las gónadas podrían impactar a nivel gonadal ya desde etapas tempranas del desarrollo.

CONTENIDO GONADAL DE TESTOSTERONA Y ESTRADIOL (RIA)

Luego quisimos evaluar los niveles intra-gonadales de T y E₂ en ratones de ambos sexos y genotipos a DPN4.

El contenido de T no presentó diferencias genotípicas en ninguno de los sexos, sin embargo, al mirar los ejes de los gráficos observamos que los niveles de T fueron mayores en machos que en hembras, como era de esperar (Figura 3.29).

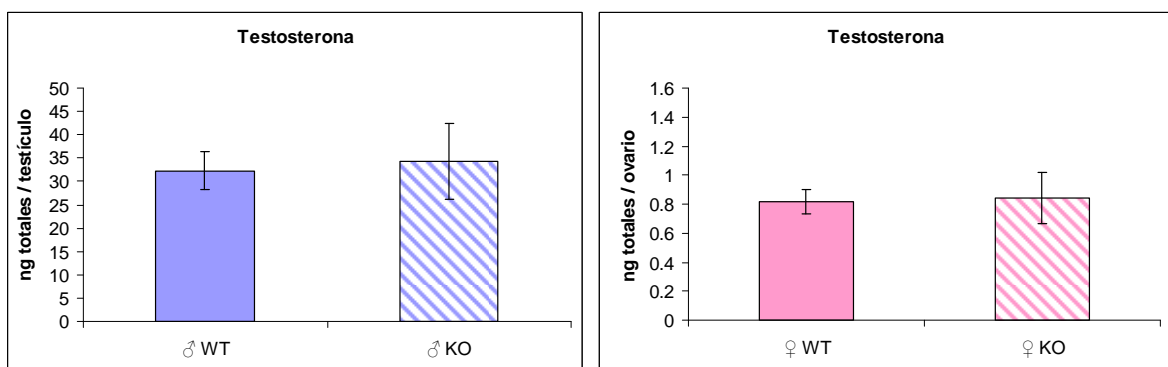


Figura 3.29: Contenido de testosterona (ng totales/gónada) en testículo (izquierda) y ovario (derecha) de ratones de 4 días de edad. Test t para cada determinación: NS. N=4-6.

En cuanto al contenido gonadal de E₂, encontramos que los machos GABA_{B1}KO presentaron un aumento en los pg totales de E₂ (p<0.01) y en los pg/mg de testículo (p<0.01) con respecto a los machos WT (Figura 3.30 izquierda). Las hembras GABA_{B1}KO presentan una tendencia (que no llega a ser significativa) a tener un mayor contenido total de E₂ por ovario con respecto a las hembras WT (p=0.08) (Figura 3.30 derecha). El contenido de E₂/mg de ovario presentó un aumento significativo claro con respecto a las WT (p<0.01) (Figura 3.30 derecha).

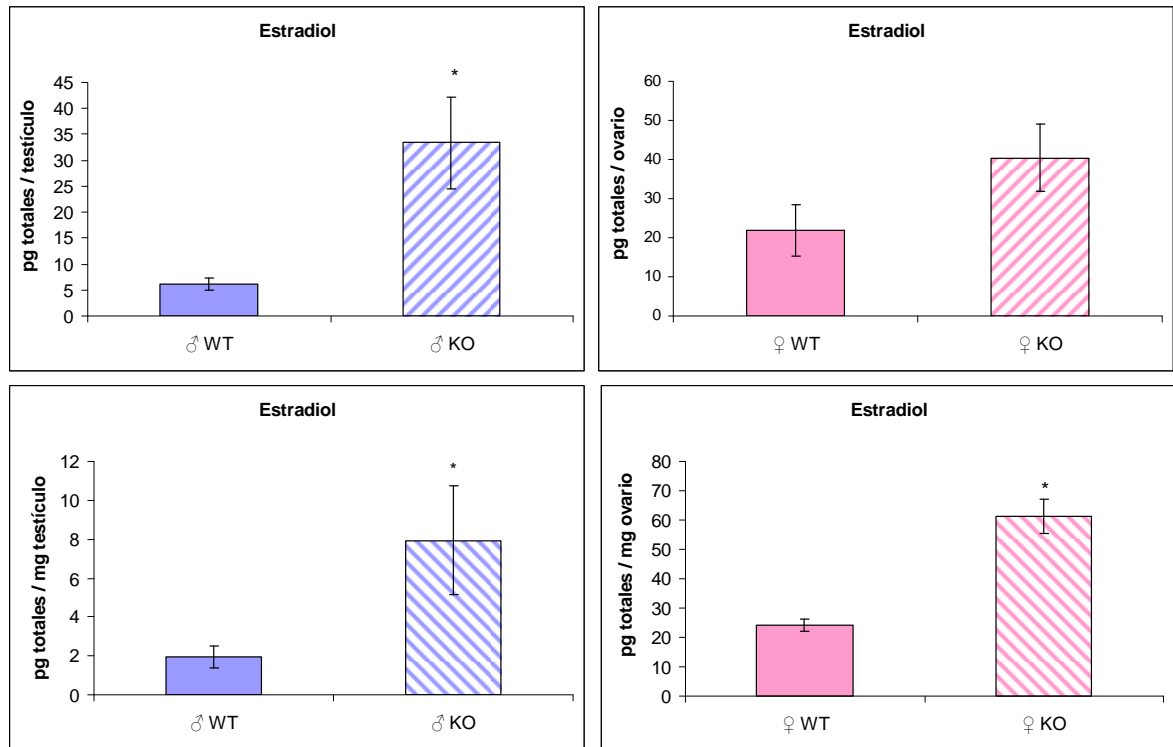


Figura 3.30: Contenido de estradiol (pg totales/gónada) en testículo (izquierda) y ovario (derecha) de ratones de 4 días de edad. Test t para cada determinación p<0.01. *: Estradiol en ratones GABA_{B1}KO distinto de WT. N=4-6.

El aumento del contenido de E₂ en los testículos de los machos GABA_{B1}KO está de acuerdo con el aumento en la expresión de *Cyp19a1* detectado. Además al observar el eje de los gráficos se puede ver que el contenido de E₂ es mayor en hembras que en machos, lo cual también coincide con el hecho que para detectar *Cyp19a1* en machos tuvimos que partir de una RT más concentrada que para hembras.

Nos resultó interesante en el caso del contenido de E₂ analizar tanto el total por gónada como el contenido por mg de tejido ya que cada uno presenta información distinta. El contenido total da una idea de los niveles circulantes de E₂ (ya que no es

detectable en suero a esta edad, observación personal del Dr. Kauffman (Haisenleder *et al.* 2011)), mientras que el contenido por mg de tejido nos permite demostrar diferencias en la síntesis local y el impacto que el E₂ pueda tener en la regulación autocrina y paracrina en la gónada y que puede perturbar el correcto desarrollo y/o funcionalidad de la misma.

Para descartar que las diferencias mencionadas en el contenido de estradiol sean debidas al peso corporal de las crías o de las gónadas, comparamos ambos parámetros entre los grupos.

Ni el peso corporal de las crías ni el peso de las gónadas (Tabla 3.2) resultaron afectados por el genotipo.

Tabla 3.2: Peso de las crías (gr) y de las gónadas (mg) de ratones a DPN4. Peso crías: ANOVA en dos sentidos NS. Peso gónadas: ANOVA en dos sentidos: interacción NS, efecto principales sexo p<0.01. *: peso testicular distinto del peso ovárico. N=5-12.

Grupo	Peso (gr)	Peso gónada (mg)
♂ WT	2.85 ± 0,19	2.70 ± 0.36 *
♂ KO	2.73 ± 0.31	2.52 ± 0.31 *
♀ WT	2.90 ± 0.15	0.88 ± 0.18
♀ KO	2.99 ± 0.13	0.90 ± 0.14

DISCUSIÓN III

En los capítulos anteriores de la presente Tesis hemos demostrado que la falta del RGABA_B funcional causa alteraciones a nivel del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en ratones adultos que no involucran diferencias en la expresión de *Kiss1* en áreas críticas para la reproducción, como lo son el AVPV/PeN o el ARC. También demostramos un incremento muy sorprendente de la expresión de *Kiss1* en áreas extra-hipotalámicas, íntimamente relacionadas con el control de comportamientos sexualmente específicos, los que aparecen durante o posteriormente al inicio de la pubertad.

En este capítulo nos propusimos evaluar si la ausencia del RGABA_B afecta el desarrollo y la diferenciación sexual del cerebro y el correcto ensamblado de los

sistemas GnRH y *Kiss1* en edades tempranas del desarrollo, como lo es DPN4. Ésta es una edad en la cual los principales eventos que determinan la diferenciación sexual del cerebro ya han ocurrido (los dos picos de testosterona perinatales) pero este proceso se encuentra aún desarrollo, dado que se postula que finaliza alrededor del día 7 postnatal (Kauffman 2010). Las alteraciones que puedan ocurrir en este sistema durante este periodo crítico pueden dejar su impronta y modificar el correcto funcionamiento del eje en la adultez.

Dado que el GABA ha sido previamente involucrado en la regulación de la migración de neuronas GnRH (Heger *et al.* 2003; Lee *et al.* 2008a; Wierman *et al.* 2011), proceso que se encuentra completo al momento del nacimiento en ratones (Wierman *et al.* 2004), quisimos evaluar si la migración o el número de neuronas GnRH se encontraban alteradas en ratones GABA_{B1}KO. No encontramos diferencias ni durante en la localización ni en el número de las neuronas ir-GnRH en el BO o en el OVLT-APO a DPN4. Por lo tanto no encontramos evidencias de una migración anormal de neuronas GnRH en ausencia del RGABA_B, en concordancia con estudios farmacológicos previos (Tobet *et al.* 2001). Sin embargo, la pulsatilidad de GnRH se encuentra aumentada en las hembras adultas GABA_{B1}KO. En cuanto a esto, se sabe que para que las neuronas de GnRH cumplan su rol fisiológico normal en la adultez, sus axones deben extenderse desde el soma en el área rostral del hipotálamo hasta la EM en el HMB, proceso que ocurre en edades tempranas del desarrollo (Livne *et al.* 1993a). Recientemente, se demostró que los RGABA_B tienen un rol importante en la maduración de la morfología dendrítica y axónica (Bony *et al.* 2013), lo cual podría justificar las alteraciones fisiológicas encontradas en las hembras adultas.

Alteraciones a nivel central en *Kiss1*, *Gnrh1*/GnRH y *Gad1*/GABA

En el HA, tanto el ARNm como el contenido peptídico de GnRH no se encontraron alterados por la falta del RGABA_B. La expresión de *Gnrh1* fue similar en ambos sexos, como fuera previamente descrito por Gore y col. (Gore *et al.* 1999). En cuanto al contenido de GnRH, observamos que fue mayor en los machos con respecto a las hembras, distinto a lo encontrado en la expresión, sugiriendo una regulación post-transcripcional de GnRH (Gore & Roberts 1997), de manera sexo-específica. Aunque la expresión de *Kiss1* no fue consistentemente detectada en el AVPV/PeN por medio de

la técnica de HIS antes de DPN10 (Semaan *et al.* 2010; Kauffman 2010; Cao & Patisaul 2011; Takumi *et al.* 2011), nosotros evaluamos su expresión por qPCR a DPN4. Por primera vez se detectaron niveles muy bajos de *Kiss1* en este núcleo que, a su vez, mostraron una diferencia sexual, la expresión en machos fue mayor a hembras, inversa a la que se observará después en la adultez. También evaluamos la expresión del receptor de kisspeptina (*Kiss1r*) en HA. En los animales WT los niveles de expresión de *Kiss1r* se corresponden con los niveles de *Kiss1* (machos mayor a hembras). En los animales GABA_{B1}KO se mantiene la diferencia sexual aunque los niveles de expresión del *Kiss1r* son muchísimo más bajos que en los WT. Este es un resultado muy original, ya que sugiere que los efectos de *Kiss1* podrían estar impedidos a esta edad en los ratones GABA_{B1}KO. Luego evaluamos la expresión de *Gad1* en el HA y establecimos que fue mayor en los machos con respecto a las hembras, como se describió previamente (Davis *et al.* 1996). La expresión de *Gad1* se correspondió con el contenido hipotalámico de GABA (machos mayor a hembras), en concordancia con los resultados de Flügge y col. (Flügge *et al.* 1986). Sin embargo, ni la expresión de *Kiss1*, ni la de *Gad1* se alteraron a esta edad en el HA por la falta del RGABA_B. Se sabe que la acción de GABA a través de los RGABA_A es principalmente estimuladora en las neuronas de GnRH desde los estadios embrionarios hasta estadios prepuberales (Maffucci & Gore 2009). Por lo tanto, proponemos que el alto contenido de GABA en el HA de los machos a DPN4 podría estar estimulando la síntesis peptídica de GnRH, además de un posible *input* en el mismo sentido por parte de *Kiss1*. En resumen, estos resultados demuestran que existe una diferencia sexual en el contenido de GnRH y GABA en HA y que la falta del RGABA_B no estaría actuando sobre estos parámetros sexualmente dimórficos. Estos resultados no nos sorprenden, dado que se sabe que GABA no participa en la diferenciación sexual de este área (Schwarz & McCarthy 2008a).

Sin embargo, al evaluar el ARC/HMB encontramos un escenario completamente diferente. Aquí, GABA ha sido postulado como el principal efector de la diferenciación sexual inducida por E₂ (Schwarz & McCarthy 2008a). Aunque existen pocas neuronas GnRH en el HMB (Livne *et al.* 1993b; Kimura & Funabashi 1998), el ARNm de *Gnrh1* puede ser transportado axonalmente y regulado a este nivel (Herman & Tomaszewska-

Zaremba 2010). Nosotros encontramos un patrón particular en la expresión de *Gnrh1* en el HMB, sin diferencias sexuales en los ratones WT, como lo observado en HA, mientras que en los ratones GABA_{B1}KO se observó que las hembras tenían niveles de expresión mayores con respecto a los machos. Además, como en el HA, el contenido de GnRH en el HMB fue mayor en machos WT con respecto a hembras WT y esta diferencia sexual se pierde en los ratones GABA_{B1}KO y tiende a aumentar en hembras GABA_{B1}KO con respecto a hembras WT, similar a lo observado en la expresión de *Gnrh1*.

Estas diferencias genotípicas y sexuales en la expresión y el contenido de GnRH en HMB no podrían ser atribuidas a una regulación por parte de kisspeptina, dado que la expresión de *Kiss1* en el ARC de ratones WT mostró niveles mayores en hembras con respecto a machos, como se describió previamente (Cao & Patisaul 2011; Takumi *et al.* 2012; Poling & Kauffman 2012b). Interesantemente, esta diferencia sexual se perdió en los ratones GABA_{B1}KO, debido a una disminución significativa en la expresión de *Kiss1* en hembras GABA_{B1}KO con respecto a las WT. Estos resultados sugerirían que la síntesis aumentada de GnRH en las hembras GABA_{B1}KO no es dirigida por kisspeptina, en concordancia con resultados previos que reportaban que los niveles de GnRH no dependían de kisspeptina a esta edad (Poling & Kauffman 2012b). Además, esta hipótesis está también reforzada por los muy bajos niveles de expresión del *Kiss1r* en el HMB de las hembras GABA_{B1}KO a esta edad. Recientemente, Fiorini y col. (Fiorini & Jasoni 2010) descubrieron que kisspeptina, secretada por neuronas *Kiss1* del ARC, estimula el crecimiento de las prolongaciones de neuronas GnRH una vez que se encuentran en las inmediaciones de la EM y de esta manera asegura la correcta inervación de estas neuronas. Además, la expresión de *Kiss1* en el HMB se detectó desde E13.5, lo cual coincide con la llegada de las primeras inervaciones de neuronas GnRH a esa zona (Tobet & Schwarting 2006; Wu *et al.* 1997; Silverman *et al.* 1987). Por lo tanto, la disminución de *Kiss1* en hembras GABA_{B1}KO a DPN4, que podría ya estar presente desde etapas anteriores, podría estar afectando el normal desarrollo axonal de GnRH y causando las alteraciones fisiológicas en el sistema de GnRH observado en la adultez.

De manera sorprendente, la expresión de *Gad1* en el HMB mostró el mismo patrón que *Gnrh1* en esta zona, incluyendo una diferencia sexual presente en los ratones

GABA_{B1}KO, la cual no se observa en los WT. La correlación positiva encontrada entre la expresión de estos genes en el HMB apunta a una regulación de GnRH por parte de GABA en el HMB y/o que la ausencia del RGABA_B afecta a ambos genes de la misma manera. Esta observación también sugeriría que los RGABA_B están normalmente modulando la expresión de *Gad1* en el HMB, a diferencia del HA, de manera sexo-específica. A diferencia de lo observado en DPN4, en adultos, la falta del RGABA_B altera la expresión de *Gnrh1* y *Gad1* tanto en HA como en HMB. Otro dato importante es que no existe correlación entre la expresión de *Gnrh1* o *Gad1* con *Kiss1* en HMB, lo cual indicaría que *Kiss1* no estaría modulando la expresión de estos genes a esta edad. Los cambios observados en la expresión de *Kiss1* serían debidos a la falta del RGABA_B en las neuronas *Kiss1* del ARC, ya que, aunque el E₂ circulante pudiera estar aumentado en las hembras GABA_{B1}KO a los 4 días de edad, no ejercería un efecto a nivel central debido a la presencia de la α -fetoproteína.

El HMB controla la secreción tónica de GnRH y se encuentra activo neonatalmente, diferente a lo que ocurre con la secreción previa a la ovulación, la cual es controlada por el APO-HA y la cual se desarrolla luego en la pubertad (Kimura & Funabashi 1998). Estos resultados sugerirían que el HA podría afectarse en los ratones GABA_{B1}KO una vez que esta región comienza a ser activa en la regulación de GnRH en la pubertad y adultez.

En este capítulo, además de evaluar el contenido hipotalámico de GABA, quien juega un rol importantísimo en la regulación de GnRH (Martinez *et al.* 1994; Lakhanpal & Kaur 2007; Christian & Moenter 2007; Clarkson & Herbison 2006a; Martin *et al.* 2007; Christian & Moenter 2007; Grove-Strawser *et al.* 2007), también investigamos otros neurotransmisores aminoacídicos involucrados en la regulación de GnRH y relacionados con el sistema GABAérgico, como lo son el glutamato, precursor biosintético de GABA (Mahesh & Brann 2005; Clarkson & Herbison 2006a; Bailey *et al.* 2006; Parent *et al.* 2005) y la taurina (Arias *et al.* 1995; Feleder *et al.* 1999), propuesta como un agonista de los receptores GABAérgicos tanto GABA_A como GABA_B (del Olmo *et al.* 2000; Belluzzi *et al.* 2004; Behar *et al.* 2001). Sin embargo, ninguno de estos neurotransmisores se encontraron afectados por la falta del RGABA_B a los 4 días de edad.

Alteraciones a nivel hipofisario y gonadal

Fisiológicamente, las alteraciones en el sistema de GnRH podrían tener consecuencias a nivel hipofisario. Si bien la expresión del *Gnrh1r* no presentó diferencias genotípicas, detectamos un aumento en el contenido de LH en las hipófisis de hembras GABA_{B1}KO comparado con las WT, el cual podría deberse tanto a una secreción/pulsatilidad de GnRH alterada, como sucede en el adulto, y/o a la ausencia de RGABA_B en la hipófisis. En cuanto a los niveles séricos de LH, se encontró una diferencia sexual (hembras mayor a machos) que también fue descrita por Poling y col. en ratones de DPN1 (Poling & Kauffman 2012b). Además, los niveles séricos de LH se encontraron elevados tanto en machos como en hembras GABA_{B1}KO con respecto a los WT, manteniendo la diferencia sexual. En resultados previos, demostramos que la estimulación de los RGABA_B en la adenohipófisis inhibe la secreción de LH (Lux-Lantos *et al.* 2001) y que la ausencia de RGABA_B induce un aumento en la secreción basal de LH en cultivo primario de células adenohipofisarias de ratones adultos GABA_{B1}KO (Catalano *et al.* 2010). Además, la expresión de RGABA_B es máxima en etapas neonatales y luego disminuye a lo largo del desarrollo y los niveles proteicos son mayores en hembras que en machos (Bianchi *et al.* 2001). Cualquiera sea el origen del aumento de LH en los ratones de DPN4, aparentemente estaría estimulando la síntesis de estrógenos en las gónadas, dado que el contenido de E₂ se encontró elevado tanto en testículo y marginalmente en ovario de ratones GABA_{B1}KO de DPN4, sin encontrarse alteraciones en el contenido de T. Aunque el estímulo natural de la síntesis de aromatasa es FSH (no se encontró alterada en nuestro modelo), se ha postulado que LH puede inducir la síntesis y actividad de aromatasa, especialmente cuando los receptores de LH están presentes en niveles bajos (Andric & Ascoli 2008). Cuando evaluamos la expresión de *Cyp19a1* en las gónadas, se encontró aumentada sólo en los machos GABA_{B1}KO con respecto a los WT, lo cual coincide con un aumento del contenido aumentado de E₂ en testículo. En las hembras GABA_{B1}KO no se encontraron diferencias genotípicas en la expresión de *Cyp19a1*, aunque no podemos descartar que la actividad enzimática se encuentre alterada. Alternativamente, el incremento en el contenido de E₂ (pg/mg tejido) en las gónadas de GABA_{B1}KO puede ser consecuencia de la ausencia local de los RGABA_B, los cuáles se expresan normalmente tanto en ovarios (Kaupmann *et al.* 1997; Kaupmann *et al.* 1998) como en testículos (Vidal *et al.* 2008), sugiriendo que los RGABA_B podrían estar regulando negativamente la síntesis

y/o actividad de aromatasa gonadal. Es de hacer notar que, tanto la expresión hipotalámica de *Pgr* y *Th* como los niveles séricos de PRL, factores que se encuentran regulados por E₂, no se vieron afectados en los ratones GABA_{B1}KO, sugiriendo que los niveles de E₂ circulante no se encontrarían afectados y que la disminución de la expresión de *Kiss1* en el ARC de hembras GABA_{B1}KO de DPN4 se debería específicamente a la falta del RGABA_B en estas neuronas y no sería la consecuencia de la retroalimentación negativa ejercida por los niveles circulantes de E₂. Aunque la expresión de *Cyp19a1* se vió elevada en HA de ratones GABA_{B1}KO, no podemos saber si esto da lugar a un aumento en la actividad de la enzima, con un consecuente aumento de síntesis local de E₂, que en ese caso estaría afectando únicamente la expresión de *Kiss1* en el ARC de las hembras GABA_{B1}KO, dado que no se observaron cambios en *Pgr* o *Th*. El aumento del E₂ ovárico (pg/mg tejido) podría tener efectos locales y alterar el normal desarrollo ovárico y, de esta manera, contribuir al fenotipo alterado observado en los ratones adultos GABA_{B1}KO.

CONCLUSIÓN III

En resumen, estos resultados demuestran que la falta de un RGABA_B funcional no ejerce marcados efectos en la expresión de genes importantes para el control reproductivo en el HA en esta temprana etapa postnatal. En cambio, importantes diferencias en la expresión de estos genes se observaron en los ratones GABA_{B1}KO en el HMB, sugiriendo la importancia de la presencia de este receptor en esta región hipotalámica. Estos resultados contribuirían a la hipótesis que el sistema GABAérgico es un factor crítico en el desarrollo y diferenciación sexual del ARC/HMB. El GABA, a través de los RGABA_A, ha sido postulado como un factor clave que es requerido por el E₂ perinatal para inducir la diferenciación sexual del ARC (Schwarz & McCarthy 2008a). Los resultados presentes en este capítulo, demuestran que los RGABA_B también participan en este proceso, dado que en su ausencia se alteran las diferencias sexuales de genes clave, como son *Kiss1*, *Kiss1r*, *Gnrh1* y *Gad1* en ARC/HMB (Tabla 3.3), probablemente alterando la organización y desarrollo del eje reproductivo. Estos resultados postulan, además, que *Kiss1* no estaría regulando a GnRH en esta etapa del desarrollo y que el principal modulador del decapeptido sería el sistema GABAérgico, sin descartar otros posibles factores no estudiados en este trabajo.

Tabla 3.3: resumen de los resultados obtenidos para la expresión hipotalámica (HA: hipotálamo anterior y HMB: hipotálamo medio basal) de genes clave en la reproducción a los 4 días de edad.

Genes	HA		HMB	
	WT	KO	WT	KO
<i>Kiss1</i>	♂ > ♀	♂ > ♀	♂ < ♀	♂ = ♀
<i>Kiss1r</i>	♂ > ♀	♂ > ♀	♂ = ♀	♂ > ♀
<i>Gnrh1</i>	♂ = ♀	♂ = ♀	♂ = ♀	♂ < ♀
<i>Gad1</i>	♂ > ♀	♂ > ♀	♂ = ♀	♂ < ♀

CONCLUSIÓN FINAL

A continuación presentamos un resumen de los resultados más importantes encontrados a lo largo de esta Tesis en nuestro modelo experimental, los ratones GABA_{B1}KO, en las distintas etapas del desarrollo estudiadas:

Adultos GABA_{B1}KO

- ✚ Alteración de la expresión sexual dimórfica de genes clave en la reproducción (*Gnrh1*, *Gad1*, *Pgr*, *Th*) en el HA.
- ✚ Aumento del sistema kisspeptidérgico en áreas extra-hipotalámicas, tales como MeA, BNST y *septum* lateral, relacionadas con comportamientos sexuales que ocurren durante o luego del inicio de la pubertad.
- ✚ Aumento en la frecuencia de pulsatilidad de secreción de GnRH, la cual no estaría dada por alteraciones a nivel de *Kiss1* en AVPV/PeN y ARC (poblaciones clave en el control del eje gonadotrófico, en dónde la co-expresión de *RGABA_{B1}* es altísima). Este aumento de la pulsatilidad daría lugar a un aumento en la expresión del *Gnrh1r* en la hipófisis de hembras.
- ✚ Alteraciones a nivel de la respuesta hipotalámica de las hembras frente a la estimulación con agonistas kisspeptidérgicos (Kiss-10), sugiriendo un impedimento en la desensibilización del *Kiss1r*.
- ✚ Disminución del porcentaje de ovulación y del segundo pico de FSH que daría lugar a las fallas en la ciclicidad y fertilidad de las hembras.

Neonatos de 4 días de edad GABA_{B1}KO

- ✚ Alteración de la expresión sexual dimórfica de genes clave en la reproducción (*Kiss1*, *Kiss1r*, *Gnrh1*, *Gad1*) en el HMB.
- ✚ GnRH no se encontraría regulado por kisspeptina a esta edad, sino por GABA, y los *RGABA_B* participan en esta regulación.
- ✚ Aumento en el contenido y los niveles séricos de LH en las hembras.
- ✚ Aumento del contenido de E₂ gonadal que podría dar lugar a las fallas ováricas en la adultez.

En conclusión y basándonos en estos resultados podemos decir que GABA, a través de sus RGABA_B, posee un rol importante en la regulación de la reproducción. Por un lado los RGABA_B regulan el eje gonadotrófico a diferentes niveles y por otro lado actúan en áreas extra-hipotalámicas de expresión de *Kiss1* relacionadas con la conducta sexual. Sin embargo, el impacto de la falta de un RGABA_B funcional es distinto de acuerdo a la edad evaluada. Mientras que en los ratones de 4 días de edad los mayores cambios se observan en el ARC/HMB, en los ratones adultos aparecen en el HA. Por ende, GABA, a través de sus RGABA_B, interactuaría con GnRH y kisspeptina en la regulación del eje reproductivo de manera diferencial en sus distintos niveles durante el desarrollo y en la adultez, y en forma diferencial entre los sexos.

Las manifiestas alteraciones observadas en el eje hipotálamo-hipófiso-ovárico en las hembras GABA_{B1}KO aportan al entendimiento de las posibles causas de los desórdenes reproductivos observados en pacientes con epilepsia, por lo menos en aquellas en las que etiopatogenia de su enfermedad radica en alteraciones de la funcionalidad de los RGABA_B (Wang *et al.* 2008; Lancaster *et al.* 2010).

Estos resultados alertan también a los posibles efectos colaterales que podrían aparecer sobre el eje reproductivo ante tratamientos prolongados con análogos de estos receptores.

BIBLIOGRAFÍA

Adler BA & Crowley WR. *Evidence for Aminobutyric acid modulation of ovarian hormonal effects on luteinizing hormone secretion and hypothalamic catecholamine activity in female rats.* 1986. *Endocrinology* 118 91-97.

Akema T & Kimura F. *2-Hydroxysaclofen, a potent GABA B receptor antagonist, stimulates luteinizing hormone secretion in female rats.* 1991. *Brain Research* 546 143-145.

Akema T & Kimura F. *Modulation of pulsatile LH secretion by baclofen, a selective GABA B receptor agonist, in ovariectomized rats.* 1992. *Neuroendocrinology* 56 141-147.

Anderson R & Mitchell R. *Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonist on the secretion of growth hormone, luteinizing hormone, adrenocorticotrophic hormone and thyroid-stimulating hormone from the rat pituitary gland in vitro.* 1986. *Journal of Endocrinology* 108 1-8.

Andreu C, Parborell F, Vanzulli S, Chemes H & Tesone M. *Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis.* 1998. *Molecular Reproduction and Development* 51 287-294.

Andric N & Ascoli M. *Mutations of the lutropin/choriogonadotropin receptor that do not activate the phosphoinositide cascade allow hCG to induce aromatase expression in immature rat granulosa cells.* 2008. *Mol.Cell Endocrinol.* 285 62-72.

Apud JA, Masotto C & Racagni G. *Effect of THIP and SL 76002, two clinically experimented GABA-mimetic compounds, on anterior pituitary GABA receptors and prolactin secretion in the rat.* 1987. *Life Sciences* 40 871-881.

Arias P, Feleder C, Rodriguez M, Ginzburg M, Refojo D, Szwarcfarb B & Moguilevsky JA. *Repeated intracerebroventricular administration of taurine lowers LH levels and postpones vaginal opening in peripubertal female rats.* 1995. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 85 137-139.

Arimura A 2004 Hypothalamic Hormones. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, pp 41-58. Eds PM Conn & ME Freeman. New Jersey: Human Press.

Arrati PG, Carmona C, Dominguez G, Beyer C & Rosenblatt JS. *GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats.* 2006. *Physiol Behav.* 87 51-65.

Attardi B & Happe HK. *Modulation of the estradiol-induced luteinizing hormone surge by progesterone or antiestrogens: effects on pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors.* 1986. *Endocrinology* 119 274-283.

Bailey JD, Centers A & Jennes L. *Expression of AMPA receptor subunits (GluR1-GluR4) in gonadotrophin-releasing hormone neurones of young and middle-aged persistently oestrous rats during the steroid-induced luteinising hormone surge.* 2006. *Journal of Neuroendocrinology* 18 1-12.

Baum MJ. *Sexual differentiation of pheromone processing: links to male-typical mating behavior and partner preference.* 2009. *Horm.Behav.* 55 579-588.

Becu D & Libertun C. *Comparative maturation of the regulation of prolactin and TSH by serotonin and TRH in male and female rats.* 1982. *Endocrinology* 110 1879-1884.

- Bedecarrats GY & Kaiser UB. *Differential regulation of gonadotropin subunit gene promoter activity by pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in perfused L beta T2 cells: role of GnRH receptor concentration*. 2003. *Endocrinology* 144 1802-1811.
- Behar TN, Li YX, Tran HT, Ma W, Dunlap V, Scott C & Barker JL. *GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms*. 1996. *Journal of Neuroscience* 16 1808-1818.
- Behar TN, Smith SV, Kennedy RT, McKenzie JM, Maric I & Barker JL. *GABA(B) receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells*. 2001. *Cereb.Cortex* 11 744-753.
- Belluzzi O, Puopolo M, Benedusi M & Kratskin I. *Selective neuroinhibitory effects of taurine in slices of rat main olfactory bulb*. 2004. *Neurosciences* 124 929-944.
- Bergen HT, Hejtmancik JF & Pfaff DW. *Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonists and antagonist on LHRH-synthesizing neurons as detected by immunocytochemistry and in situ hybridization*. 1991. *Experimental Brain Research* 87 46-56.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J & Gassmann M. *Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors*. 2004. *Physiological Reviews* 84 835-867.
- Bettler B & Tiao JY. *Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABA(B) receptors*. 2006. *Pharmacol.Ther.* 110 533-543.
- Bianchi MS, Rey-Roldán EB, Bettler B, Ristig D, Malitschek B, Libertun C & Lux-Lantos V. *Ontogenic expression of anterior pituitary GABA_B receptor subunits*. 2001. *Neuropharmacology* 40 185-192.
- Bilger M, Heger S, Brann DW, Paredes A & Ojeda SR. *A conditional tetracycline-regulated increase in Gamma amino butyric acid production near luteinizing hormone-releasing hormone nerve terminals disrupts estrous cyclicity in the rat*. 2001. *Endocrinology* 142 2102-2104.
- Blein S, Hawrot E & Barlow P. *The metabotropic GABA receptor: molecular insights and their functional consequences*. 2000. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57 635-650.
- Bless EP, Westaway WA, Schwarting GA & Tobet SA. *Effects of gamma-aminobutyric acid(A) receptor manipulation on migrating gonadotropin-releasing hormone neurons through the entire migratory route in vivo and in vitro*. 2000. *Endocrinology* 141 1254-1262.
- Bo T, Mao DA, Yin Q, Chen Y, Zhu XH, Li YF & Chen PY. *[Effects of neonatal recurrent seizures on gamma-aminobutyric acid B1 receptor expression in the rat brain]*. 2006. *Zhongguo Dang.Dai Er.Ke.Za Zhi.* 8 402-407.
- Bony G, Szczurkowska J, Tamagno I, Shelly M, Contestabile A & Cancedda L. *Non-hyperpolarizing GABAB receptor activation regulates neuronal migration and neurite growth and specification by cAMP/LKB1*. 2013. *Nat.Comm.* 4 1800.
- Bormann J & Feigenspan A. *GABAC receptors*. 1995. *Trends Neurosci.* 18 515-519.
- Bowery N. *GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology*. 1989. *Trends Pharmacol Sci.* 10 401-407.
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Raiteri M, Bonner TI & Enna SJ. *International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -Aminobutyric acid_B receptors: structure and function*. 2002. *Pharmacological Reviews* 54 247-264.

- Bowery NG, Hill DR, Hudson A, Doble AL, Middleden DN, Shaw D & Turnbull M. (-) *Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by action at a novel GABA receptor*. 1980. *Nature* 283 92-94.
- Bowery NG & Smart TG. *GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history*. 2006. *Br.J.Pharmacol.* 147 Suppl 1 S109-S119.
- Brailoiu GC, Dun SL, Ohsawa M, Yin D, Yang J, Chang JK, Brailoiu E & Dun NJ. *KiSS-1 expression and metastatin-like immunoreactivity in the rat brain*. 2005. *J.Comp Neurol.* 481 314-329.
- Brann DW & Mahesh VB. *Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion*. 1997. *Endocrine Review* 18 678-700.
- Brann DW, Zamorano PL, Putnam-Roberts CD & Mahesh VB. *GABA-opioid interactions in the regulation of gonadotropin secretion in the immature female rat*. 1992. *Neuroendocrinology* 56 445-452.
- Canteras NS, Simerly RB & Swanson LW. *Connections of the posterior nucleus of the amygdala*. 1992. *J Comp Neurol.* 324 143-179.
- Cao J & Patisaul HB. *Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors alpha and beta and Kiss1 in neonatal male and female rats*. 2011. *J.Comp Neurol.* 519 2954-2977.
- Cao J & Patisaul HB. *Sex-specific expression of estrogen receptors alpha and beta and Kiss1 in the postnatal rat amygdala*. 2013. *J Comp Neurol.* 521 465-478.
- Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, Bellido C, Dieguez C, Aguilar E, Sanchez-Criado JE, Pellicer A, Pinilla L, Gaytan F & Tena-Sempere M. *Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation?* 2006. *Endocrinology* 147 4852-4862.
- Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C & Tena-Sempere M. *Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition*. 2005. *Endocrinology* 146 3917-3925.
- Castellano JM, Roa J, Luque RM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L & Tena-Sempere M. *KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications*. 2009. *Peptides.* 30 139-145.
- Catalano PN, Bonaventura MM, Silveyra P, Bettler B, Libertun C & Lux-Lantos VA. *GABA(B1) Knockout Mice Reveal Alterations in Prolactin Levels, Gonadotropic Axis, and Reproductive Function*. 2005. *Neuroendocrinology* 82 294-305.
- Catalano PN, Di Giorgio N, Bonaventura MM, Bettler B, Libertun C & Lux-Lantos VA. *Lack of functional GABA(B) receptors alters GnRH physiology and sexual dimorphic expression of GnRH and GAD-67 in the brain*. 2010. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 298 E683-E696.
- Chan YM, Broder-Fingert S & Seminara SB. *Reproductive functions of kisspeptin and Gpr54 across the life cycle of mice and men*. 2008. *Peptides.*
- Chebib M & Johnston GA. *The "ABC" of GABA receptors: a brief review*. 1999. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiology* 26 937-940.
- Cho BN & Kim K. *Differential effect of baclofen on hypothalamic GnRH and pituitary LH beta gene expression in steroid-treated rats*. 1997. *Mol Cells* 7 605-609.
- Choe HK, Kim HD, Park SH, Lee HW, Park JY, Seong JY, Lightman SL, Son GH & Kim K. *Synchronous activation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription and secretion by pulsatile kisspeptin stimulation*. 2013. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 110 5677-5682.

- Christian CA & Moenter SM. *Estradiol induces diurnal shifts in GABA transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons to provide a neural signal for ovulation.* 2007. *Journal of Neuroscience* 27 1913-1921.
- Chu Z & Moenter SM. *Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors modulates GABAergic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons and alters their firing rate: a possible local feedback circuit.* 2005. *Journal of Neuroscience* 25 5740-5749.
- Clarkson J, Boon WC, Simpson ER & Herbison AE. *Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset.* 2009a. *Endocrinology* 150 3214-3220.
- Clarkson J, d'Anglemont dT, X, Colledge WH, Caraty A & Herbison AE. *Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain.* 2009b. *Journal of Neuroendocrinology* 21 673-682.
- Clarkson J & Herbison AE. *Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neuron in relation to puberty.* 2006a. *Mol.Cell Endocrinol.* 254-255 32-38.
- Clarkson J & Herbison AE. *Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons.* 2006b. *Endocrinology* 147 5817-5825.
- Colledge WH. *GPR54 and kisspeptins.* 2008. *Results Probl.Cell Differ.* 46 117-143.
- Colledge WH. *Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology.* 2009. *Peptides.* 30 34-41.
- Constantin S, Caraty A, Wray S & Duittoz AH. *Development of gonadotropin-releasing hormone-1 secretion in mouse nasal explants.* 2009. *Endocrinology* 150 3221-3227.
- Constantin S, Piet R, Iremonger K, Hwa YS, Clarkson J, Porteous R & Herbison AE. *GnRH neuron firing and response to GABA in vitro depend on acute brain slice thickness and orientation.* 2012. *Endocrinology* 153 3758-3769.
- Cooke BM & Simerly RB. *Ontogeny of bidirectional connections between the medial nucleus of the amygdala and the principal bed nucleus of the stria terminalis in the rat.* 2005. *J Comp Neurol.* 489 42-58.
- Coolen LM & Wood RI. *Testosterone stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala in the control of male hamster sexual behavior: redundancy without amplification.* 1999. *Behav.Brain Res.* 98 143-153.
- Cravo RM, Margatho LO, Osborne-Lawrence S, Donato J, Jr., Atkin S, Bookout AL, Rovinsky S, Frazao R, Lee CE, Gautron L, Zigman JM & Elias CF. *Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models.* 2011. *Neurosciences* 173 37-56.
- Crawford ML & Young JM. *GABAB receptor-mediated inhibition of histamine H1-receptor-induced inositol phosphate formation in slices of rat cerebral cortex.* 1988. *J Neurochem.* 51 1441-1447.
- Crews D. *Evolution of neuroendocrine mechanisms that regulate sexual behavior.* 2005. *Trends Endocrinol.Metab* 16 354-361.
- Cryan JF & Kaupmann K. *Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression.* 2005. *Trends Pharmacology Sciences* 26 36-43.
- Cryan JF & Slattery DA. *GABAB receptors and depression. Current status.* 2010. *Adv.Pharmacol* 58 427-451.

- Csabafi K, Jaszberenyi M, Bagosi Z, Liptak N & Telegdy G. *Effects of kisspeptin-13 on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thermoregulation, anxiety and locomotor activity in rats*. 2013. *Behav.Brain Res.* 241 56-61.
- d'Anglemont dT, X, Fagg LA, Carlton MB & Colledge WH. *Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals*. 2008. *Endocrinology* 149 3926-3932.
- d'Anglemont dT, X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA & Colledge WH. *Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene*. 2007. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104 10714-10719.
- Davis AM, Grattan DR, Selmanoff M & McCarthy MM. *Sex differences in glutamic acid decarboxylase mRNA in neonatal rat brain: implications for sexual differentiation*. 1996. *Hormones and Behavior* 30 538-552.
- De Robertis E 1986 GABAergic Neurotransmission. An Overview. In *GABA and Endocrine Function*, Eds G Racagni & AO Donoso. New York: Raven Press.
- de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL & Milgrom E. *Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54*. 2003. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 10972-10976.
- DeFazio RA, Heger S, Ojeda SR & Moenter SM. *Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons*. 2002. *Mol.Endocrinol.* 16 2872-2891.
- del Olmo N, Bustamante J, del Rio RM & Solis JM. *Taurine activates GABA(A) but not GABA(B) receptors in rat hippocampal CA1 area*. 2000. *Brain Research* 864 298-307.
- Dellovade T, Schwanzel-Fukuda M, Gordan J & Pfaff D. *Aspects of GnRH neurobiology conserved across vertebrate forms*. 1998. *Gen.Comp Endocrinol.* 112 276-282.
- Dhandapani KM & Brann DW. *The role of glutamate and nitric oxide in the reproductive neuroendocrine system*. 2000. *Biochem.Cell Biol.* 78 165-179.
- Dinkel A, Aicher WK, Warnatz K, Burki K, Eibel H & Ledermann B. *Efficient generation of transgenic BALB/c mice using BALB/c embryonic stem cells*. 1999. *J.Immunol.Methods* 223 255-260.
- Dohler KD & Wuttke W. *Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats*. 1975. *Endocrinology* 97 898-907.
- Donoso AO, Seltzer AM, Navarro CE, Cabrera RJ, Lopez FJ & Negro-Vilar A. *Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone secretion by hypothalamic amino acids*. 1994. *Braz.J Med.Biol Res.* 27 921-932.
- Driancourt MA, Gougeon A, Royère D & Thibault C 1993 Ovarian Function. In *Reproduction in Mammals and Man*, pp 281-305. Eds C Thibault & MC Levasseur. Paris: R.H.F. Hunter, Ellipses.
- Duman RS, Karbon EW, Harrington C & Enna SJ. *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*. 1986. *J Neurochem.* 47 800-810.
- Dumesic DA, Padmanabhan V & Abbott DH. *Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence*. 2008. *Obstet.Gynecol.Surv.* 63 39-48.
- Dungan Lemko HM & Elias CF. *Kiss of the mutant mouse: how genetically altered mice advanced our understanding of kisspeptin's role in reproductive physiology*. 2012. *Endocrinology* 153 5119-5129.

- Duthey B, Caudron S, Perroy J, Bettler B, Fagni L, Pin JP & Prezeau L. *A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA(B) receptor*. 2002. *J Biol Chem* 277 3236-3241.
- Erdo SL, Riesz M, Karpati E & Szporny L. *GABAB receptor-mediated stimulation of the contractility of isolated rabbit oviduct*. 1984. *Eur.J.Pharmacol.* 99 333-336.
- Feleder C, Ginzburg M, Wuttke W, Moguilevsky JA & Arias P. *GABAergic activation inhibits the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and sexual development in the immature female rat. Associated changes in hypothalamic glutamatergic and taurinergic systems*. 1999. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 116 151-157.
- Feleder C, Jarry H, Leonhardt S, Moguilevsky JA & Wuttke W. *Evidence to suggest that gonadotropin-releasing hormone inhibits its own secretion by affecting hypothalamic amino acid neurotransmitter release*. 1996. *Neuroendocrinology* 64 298-304.
- Fernandez MO, Bianchi MS, Lux-Lantos VA & Libertun C. *Neonatal Exposure to Bisphenol A Alters Reproductive Parameters and Gonadotropin Releasing Hormone Signaling in Female Rats*. 2009. *Environ.Health Perspect.* 117 757-762.
- Fink G 1988 Gonadotropin secretion and its control. In *The physiology of reproduction*, pp 1349-1377. Eds E Knobil & JD Neill. New York: Raven Press.
- Fink G 2000 Neuroendocrine regulation of pituitary function. In *Neuroendocrinology in physiology and medicine*, pp 107-133. Eds PM Conn & ME Freeman. Totowa NJ: Humana Press.
- Finn PD, Steiner RA & Clifton DK. *Temporal patterns of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), c-fos, and galanin gene expression in GnRH neurons relative to the luteinizing hormone surge in the rat*. 1998. *J Neurosci.* 18 713-719.
- Fiorentino H, Kuczewski N, Diabira D, Ferrand N, Pangalos MN, Porcher C & Gaiarsa JL. *GABA(B) receptor activation triggers BDNF release and promotes the maturation of GABAergic synapses*. 2009. *Journal of Neuroscience* 29 11650-11661.
- Fiorini Z & Jasoni CL. *A novel developmental role for kisspeptin in the growth of gonadotrophin-releasing hormone neurites to the median eminence in the mouse*. 2010. *Journal of Neuroendocrinology* 22 1113-1125.
- Fiszer de Plazas S, Becu D, Mitridate de Novara A & Libertun C. *GABA receptors in anterior pituitary and brain areas after median eminence lesions*. 1982. *Endocrinology* 111 1974-1978.
- Flügge G, Wuttke W & Fuchs E. *Postnatal development of transmitter systems: sexual differentiation of the GABAergic system and effects of muscimol*. 1986. *Int.J.Devl.Neuroscience* 4 319-326.
- Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y & Caraty A. *Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha*. 2006. *Neurosciences Letters* 401 225-230.
- Franklin TR, Shin J, Jagannathan K, Suh JJ, Detre JA, O'Brien CP & Childress AR. *Acute baclofen diminishes resting baseline blood flow to limbic structures: a perfusion fMRI study*. 2012. *Drug Alcohol Depend.* 125 60-66.
- Freeman ME 1986 The ovarian cycle of the rat. In *The physiology of reproduction*, edn 1, pp 2323-2349. Eds E Knobil & JD Neill. New York: Raven Press,Ltd.
- Fuchs E, Mansky T, Stock KW, Vijayan E & Wuttke W. *Involvement of catecholamines and glutamate in GABAergic mechanism regulatory to luteinizing hormone and prolactin secretion*. 1984. *Neuroendocrinology* 38 484-489.

- Fueshko SM, Key S & Wray S. *GABA inhibits migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in embryonic olfactory explants*. 1998a. *Journal of Neuroscience* 18 2560-2569.
- Fueshko SM, Key S & Wray S. *Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neurons maintained in nasal explants decrease LHRH messenger ribonucleic acid levels after activation of GABA(A) receptors*. 1998b. *Endocrinology* 139 2734-2740.
- Fujioka H, Yamanouchi K, Akema T & Nishihara M. *The Effects of GABA on embryonic gonadotropin-releasing hormone neurons in rat hypothalamic primary culture*. 2007. *J.Reprod Dev.* 53 323-331.
- Fukui M, Nakamichi N, Yoneyama M, Ozawa S, Fujimori S, Takahata Y, Nakamura N, Taniura H & Yoneda Y. *Modulation of cellular proliferation and differentiation through GABA(B) receptors expressed by undifferentiated neural progenitor cells isolated from fetal mouse brain*. 2008. *J.Cell Physiol* 216 507-519.
- Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ & Gustafson EL. *The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system*. 2003. *Biochemical Biophysical Research Communication* 312 1357-1363.
- Galvez T, Urwyler S, Prezeau L, Mosbacher J, Joly C, Malitschek B, Heid J, Brabet I, Froestl W, Bettler B, Kaupmann K & Pin JP. *Ca(2+) requirement for high-affinity gamma-aminobutyric acid (GABA) binding at GABA(B) receptors: involvement of serine 269 of the GABA(B)R1 subunit*. 2000. *Mol Pharmacol* 57 419-426.
- Gamel-Didelon K, Corsi C, Pepeu G, Jung H, Gratzl M & Mayerhofer A. *An autocrine role for pituitary GABA: activation of GABA-B receptors and regulation of growth hormone levels*. 2002. *Neuroendocrinology* 76 170-177.
- Gamel-Didelon K, Kunz L, Föhr J, Gratzl M & Mayerhofer A. *Molecular and physiological evidence for functional gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptors in growth hormone-secreting cells*. 2003. *J Biol Chem* 278 20192-20195.
- Garcia-Galiano D, Pineda R, Roa J, Ruiz-Pino F, Sanchez-Garrido MA, Castellano JM, Aguilar E, Navarro VM, Pinilla L & Tena-Sempere M. *Differential modulation of gonadotropin responses to kisspeptin by aminoacidergic, peptidergic, and nitric oxide neurotransmission*. 2012. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* 303 E1252-E1263.
- Gartner L P & Hiatt J L 1997 *Histología, texto y atlas*. DF,México: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Garyfallou VT, Lemos D & Urbanski HF. *Expression profiling of genes encoding glutamate and GABA receptor subunits in three immortalized GnRH cell lines*. 2006. *Brain Research* 1086 50-54.
- Gassmann M & Bettler B. *Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition*. 2012. *Nat.Rev.Neurosci.* 13 380-394.
- Gassmann M, Shaban H, Vigot R, Sansig G, Haller C, Barbieri S, Humeau Y, Schuler V, Muller M, Kinzel B, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, Heid J, Kelly PH, Gentry C, Jatton AL, Van der PH, Mombereau C, Lecourtier L, Mosbacher J, Cryan JF, Fritschy JM, Luthi A, Kaupmann K & Bettler B. *Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice*. 2004. *J Neurosci.* 24 6086-6097.
- Gay VL & Midgley AR, Jr. *Response of the adult rat to orchidectomy and ovariectomy as determined by LH radioimmunoassay*. 1969. *Endocrinology* 84 1359-1364.
- Geneser F 2000 Órganos de la reproducción. In *Histología sobre bases biomoleculares*, edn 3ra, pp 613-677. Ed FE Geneser. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.

- Gonzalez B, Ratner LD, Di Giorgio NP, Poutanen M, Huhtaniemi IT, Calandra RS, Lux-Lantos VA & Rulli SB. *Endogenously elevated androgens alter the developmental programming of the hypothalamic-pituitary axis in male mice*. 2011. *Mol.Cell Endocrinol.* 332 78-87.
- Gonzalez IA, Diaz-Torga G, Piroli G, Achaval-Zaia R, De Nicola AF, Libertun C & Becu-Villalobos D. *Bromocriptine restores angiotensin II response in pituitary hyperplasia*. 2000. *Mol.Cell Endocrinol* 165 67-74.
- Gore AC & Roberts JL. *Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in vivo and in vitro*. 1997. *Front Neuroendocrinol.* 18 209-245.
- Gore AC, Roberts JL & Gibson MJ. *Mechanisms for the regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the developing mouse*. 1999. *Endocrinology* 140 2280-2287.
- Gottsch ML, Clifton DK & Steiner RA. *Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis*. 2006. *Mol.Cell Endocrinol.* 254-255 91-96.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK & Steiner RA. *A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse*. 2004. *Endocrinology* 145 4073-4077.
- Gottsch ML, Navarro VM, Zhao Z, Glidewell-Kenney C, Weiss J, Jameson JL, Clifton DK, Levine JE & Steiner RA. *Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways*. 2009. *J Neurosci.* 29 9390-9395.
- Gougeon A & Lefevre B. *Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle*. 1983. *Journal of Reproduction and Fertility* 69 497-502.
- Grattan DR & Selmanoff M. *Sex differences in the activity of gamma-aminobutyric acidergic neurons in the rat hypothalamus*. 1997. *Brain Research* 775 244-249.
- Grimes JM, Ricci LA & Melloni RH, Jr. *Glutamic acid decarboxylase (GAD65) immunoreactivity in brains of aggressive, adolescent anabolic steroid-treated hamsters*. 2003. *Horm.Behav.* 44 271-280.
- Grove-Strawser D, Jimenez-Linan M & Rubin BS. *Middle-aged female rats lack the dynamic changes in GAD(67) mRNA levels observed in young females on the day of a luteinising hormone surge*. 2007. *Journal of Neuroendocrinology* 19 708-716.
- Grumbach MM. *The neuroendocrinology of human puberty revisited*. 2002. *Horm.Res.* 57 Suppl 2 2-14.
- Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A & Camacho-Arroyo I. *Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain*. 2002. *Brain Res.Bull.* 59 105-109.
- Gutierrez-Pascual E, Martinez-Fuentes AJ, Pinilla L, Tena-Sempere M, Malagon MM & Castano JP. *Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion*. 2007. *Journal of Neuroendocrinology* 19 521-530.
- Haisenleder DJ, Schoenfelder AH, Marcinko ES, Geddis LM & Marshall JC. *Estimation of estradiol in mouse serum samples: evaluation of commercial estradiol immunoassays*. 2011. *Endocrinology* 152 4443-4447.
- Halasz B 2000 The Hypothalamus as an Endocrine Organ: The Science of Neuroendocrinology. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, pp 3-21. Eds PM Conn & ME Freeman. New Jersey: Humana Press.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA & Herbison AE. *Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty*. 2005. *Journal of Neuroscience* 25 11349-11356.

- Hanchate NK, Parkash J, Bellefontaine N, Mazur D, Colledge WH, d'Anglemont dT, X & Prevot V. *Kisspeptin-GPR54 signaling in mouse NO-synthesizing neurons participates in the hypothalamic control of ovulation*. 2012. *J Neurosci*. 32 932-945.
- Harden CL & Pennell PB. *Neuroendocrine considerations in the treatment of men and women with epilepsy*. 2013. *Lancet Neurol*. 12 72-83.
- Hartman RD, He JR & Barraclough CA. *Gamma-aminobutyric acid A and B receptor antagonist increase luteinizing hormone-releasing hormone neuronal responsiveness to intracerebroventricular norepinephrine in ovariectomized estrogen-treated rats*. 1990. *Endocrinology* 127 1336-1345.
- Heger S, Seney M, Bless E, Schwarting GA, Bilger M, Mungenast A, Ojeda SR & Tobet SA. *Overexpression of glutamic acid decarboxylase-67 (GAD-67) in gonadotropin-releasing hormone neurons disrupts migratory fate and female reproductive function in mice*. 2003. *Endocrinology* 144 2566-2579.
- Herbison AE. *Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V)*. 2008. *Brain Res.Rev*. 57 277-287.
- Herbison AE, de T, X, Doran J & Colledge WH. *Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons*. 2010. *Endocrinology* 151 312-321.
- Herbison AE & Moenter SM. *Depolarising and hyperpolarising actions of GABA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: towards an emerging consensus*. 2011. *Journal of Neuroendocrinology* 23 557-569.
- Herman AP & Tomaszewska-Zaremba D. *Effect of endotoxin on the expression of GnRH and GnRHR genes in the hypothalamus and anterior pituitary gland of anestrous ewes*. 2010. *Anim Reprod Sci* 1-4 111.
- Hill DR & Bowery NG. *3H-baclofen and 3H-GABA binding to bicuculline insensitive GABA B sites in the rat brain*. 1981. *Nature* 290 149-152.
- Hines M, Allen LS & Gorski RA. *Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat*. 1992. *Brain Research* 579 321-326.
- Hoak DC & Schwartz NB. *Blockade of recruitment of ovarian follicles by suppression of the secondary surge of follicle-stimulating hormone with porcine follicular field*. 1980. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 77 4953-4956.
- Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller E, Caraty A, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Liposits Z & Kallo I. *The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons*. 2010. *Eur.J Neurosci*. 31 1984-1998.
- Huddleston GG, Michael RP, Zumpe D & Clancy AN. *Estradiol in the male rat amygdala facilitates mounting but not ejaculation*. 2003. *Physiol Behav*. 79 239-246.
- Isomoto S, Kibara M, Sakurai-Yamashita Y, Nagayama Y, Uezono Y, Yano K & Taniyama K. *Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABAB receptor*. 1998. *Biochemical Biophysical Research Communication* 253 10-15.
- Iwasaki H, Jodo E, Kawauchi A, Miki T, Kayama Y & Koyama Y. *Role of the lateral preoptic area and the bed nucleus of stria terminalis in the regulation of penile erection*. 2010. *Brain Research* 1357 70-78.
- Jaber M, Dumartin B, Sagne C, Haycock JW, Roubert C, Giros B, Bloch B & Caron MG. *Differential regulation of tyrosine hydroxylase in the basal ganglia of mice lacking the dopamine transporter*. 1999. *Eur.J Neurosci*. 11 3499-3511.

- Jaferi A, Zhou P & Pickel VM. *Enhanced dendritic availability of mu-opioid receptors in inhibitory neurons of the extended amygdala in mice deficient in the corticotropin-releasing factor-1 receptor*. 2011. *Synapse* 65 8-20.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang L-Y, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA & Gerald C. *GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2*. 1998. *Nature* 396 674-769.
- Jones SR, Gainetdinov RR, Hu XT, Cooper DC, Wightman RM, White FJ & Caron MG. *Loss of autoreceptor functions in mice lacking the dopamine transporter*. 1999. *Nat. Neurosci.* 2 649-655.
- Jordan BA & Devi LA. *G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function*. 1999. *Nature* 399 697-700.
- Kallo I, Vida B, Deli L, Molnar CS, Hrabovszky E, Caraty A, Ciofi P, Coen CW & Liposits Z. *Co-localisation of kisspeptin with galanin or neurokinin B in afferents to mouse GnRH neurones*. 2012. *J Neuroendocrinol.* 24 464-476.
- Kalra SP & Kalra PS. *Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat*. 1981. *Endocrine Review* 4 311-351.
- Kanda S, Akazome Y, Mitani Y, Okubo K & Oka Y. *Neuroanatomical evidence that kisspeptin directly regulates isotocin and vasotocin neurons*. 2013. *PLoS.One.* 8 e62776.
- Kang SH, Seong JY, Cho S, Cho H & Kim K. *Acute increase of GABAergic neurotransmission exerts a stimulatory effect on GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized, estrogen- and progesterone-treated adult female rats*. 1995. *Neuroendocrinology* 61 486-492.
- Kardong K V 2007 *Vertebrados. Anatomía comparada, función y evolución*. Madrid, España: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Karpuk N & Hayar A. *Activation of postsynaptic GABA_B receptors modulates the bursting pattern and synaptic activity of olfactory bulb juxtglomerular neurons*. 2008. *J. Neurophysiol.* 99 308-319.
- Kauffman AS. *Sexual differentiation and the Kiss1 system: hormonal and developmental considerations*. 2009. *Peptides.* 30 83-93.
- Kauffman AS. *Coming of age in the kisspeptin era: sex differences, development, and puberty*. 2010. *Mol. Cell Endocrinol.* 324 51-63.
- Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA & Tena-Sempere M. *Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat*. 2007a. *Endocrinology* 148 1774-1783.
- Kauffman AS, Navarro VM, Kim J, Clifton DK & Steiner RA. *Sex differences in the regulation of Kiss1/NKB neurons in juvenile mice: implications for the timing of puberty*. 2009. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297 E1212-E1221.
- Kauffman AS, Park JH, McPhie-Lalmansingh AA, Gottsch ML, Bodo C, Hohmann JG, Pavlova MN, Rohde AD, Clifton DK, Steiner RA & Rissman EF. *The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior*. 2007b. *Journal of Neuroscience* 27 8826-8835.
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor P, Bischoff S, Mickel S, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W & Bettler B. *Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors*. 1997. *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. *GABA B receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes*. 1998. *Nature* 396 683-687.
- Keen KL, Wegner FH, Bloom SR, Ghatei MA & Terasawa E. *An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo*. 2008. *Endocrinology* 149 4151-4157.
- Keller M, Pierman S, Douhard Q, Baum MJ & Bakker J. *The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice*. 2006. *Eur.J.Neurosci.* 23 521-530.
- Kelly DA, Varnum MM, Krentzel AA, Krug S & Forger NG. *Differential Control of Sex Differences in Estrogen Receptor alpha in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis and Anteroventral Periventricular Nucleus*. 2013. *Endocrinology*.
- Kim J, Semaan SJ, Clifton DK, Steiner RA, Dhamija S & Kauffman AS. *Regulation of kiss1 expression by sex steroids in the amygdala of the rat and mouse*. 2011. *Endocrinology* 152 2020-2030.
- Kimura F & Funabashi T. *Two Subgroups of Gonadotropin Releasing Hormone Neurons Control Gonadotropin Secretion in Rats*. 1998. *News Physiol Sci.* 13 225-231.
- Kleschevnikov AM, Belichenko PV, Faizi M, Jacobs LF, Htun K, Shamloo M & Mobley WC. *Deficits in cognition and synaptic plasticity in a mouse model of Down syndrome ameliorated by GABAB receptor antagonists*. 2012. *J Neurosci.* 32 9217-9227.
- Knight PG & Glistler C. *Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development*. 2003. *Anim Reprod.Sci.* 78 165-183.
- Kondo Y. *Lesions of the medial amygdala produce severe impairment of copulatory behavior in sexually inexperienced male rats*. 1992. *Physiol Behav.* 51 939-943.
- Krnjevic K. *How does a little acronym become a big transmitter?* 2004. *Biochem.Pharmacol.* 68 1549-1555.
- Kubota H, Katsurabayashi S, Moorhouse AJ, Murakami N, Koga H & Akaike N. *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*. 2003. *J Physiol* 551 263-276.
- Kudwa AE, Michopoulos V, Gatewood JD & Rissman EF. *Roles of estrogen receptors alpha and beta in differentiation of mouse sexual behavior*. 2006. *Neurosciences* 138 921-928.
- Kuner R, Köhr G, Grünewald S, Eisenhardt G, Bach A & Kornau H. *Role of heteromer formation in GABAB receptor function*. 1999. *Science* 283 74-77.
- Kurian JR, Keen KL, Guerriero KA & Terasawa E. *Tonic control of kisspeptin release in prepubertal monkeys: implications to the mechanism of puberty onset*. 2012. *Endocrinology* 153 3331-3336.
- Lacau-Mengido IM, Gonzalez Iglesias A, Lux-Lantos VAR, Libertun C & Becu-Villalobos D. *Ontogenic and sexual differences in pituitary GnRH receptors and intracellular Ca²⁺ mobilization induced by GnRH*. 1998. *Endocrine* 8 177-183.
- Lagrange AH, Wagner EJ, Ronnekleiv OK & Kelly MJ. *Estrogen rapidly attenuates a GABAB response in hypothalamic neurons*. 1996. *Neuroendocrinology* 64 114-123.
- Lakhanpal D & Kaur G. *Valproic Acid Alters GnRH-GABA Interactions in Cycling Female Rats*. 2007. *Cell Mol.Neurobiol.* 27 1069-1083.

- Lamberts R, Vijayan E, Graf M, Mansky T & Wuttke W. *Involvement of preoptic-anterior hypothalamic GABA neurons in the regulation of pituitary LH and prolactin release*. 1983. *Experimental Brain Research* 52 356-362.
- Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R & Dalmau J. *Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen*. 2010. *Lancet Neurol.* 9 67-76.
- Lauber AH, Romano GJ & Pfaff DW. *Sex difference in estradiol regulation of progesterin receptor mRNA in rat mediobasal hypothalamus as demonstrated by in situ hybridization*
1. 1991. *Neuroendocrinology* 53 608-613.
- Lee JH & Welch DR. *Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KISS-1*. 1997. *Cancer Research* 57 2384-2387.
- Lee JM, Tiong J, Maddox DM, Condie BG & Wray S. *Temporal migration of gonadotrophin-releasing hormone-1 neurones is modified in GAD67 knockout mice*. 2008a. *Journal of Neuroendocrinology* 20 93-103.
- Lee K, Porteous R, Campbell RE, Luscher B & Herbison AE. *Knockdown of GABA(A) receptor signaling in GnRH neurons has minimal effects upon fertility*. 2010. *Endocrinology* 151 4428-4436.
- Lee VH, Lee LT & Chow BK. *Gonadotropin-releasing hormone: regulation of the GnRH gene*. 2008b. *FEBS J.* 275 5458-5478.
- Lehman MN, Coolen LM & Goodman RL. *Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion*. 2010. *Endocrinology* 151 3479-3489.
- Lehman MN, Winans SS & Powers JB. *Medial nucleus of the amygdala mediates chemosensory control of male hamster sexual behavior*. 1980. *Science* 210 557-560.
- Lephart ED. *A review of brain aromatase cytochrome P450*. 1996. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 22 1-26.
- Leranth C, Maclusky NJ, Sakamoto H, Shanabrough M & Naftolin F. *Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area*. 1985. *Neuroendocrinology* 40 536-539.
- Levine JE 2000 The Hypothalamus as a Major Integrating Center. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, pp 75-93. Eds PM Conn & ME Freeman. New Jersey: Humana Press.
- Levine JE, Bauer-Dantoin AC, Besecke LM & Wolfe AMyc. *Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone releasing hormone pulse generation in the rat*. 1991. *Recent Progress in Hormone Research.* 47 97-153.
- Li XF, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, Knox AM, Lin Y, Petrou NA, Roseweir A, Lightman SL, Milligan SR, Millar RP & O'Byrne KT. *Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat*. 2009. *PLoS.One.* 4 e8334.
- Li XF & Liu LQ. *Progress in studies on the role of gamma-aminobutyric acid*. 2012. *Chin Med.J (Engl.)* 125 1322-1330.
- Liang F, Hatanaka Y, Saito H, Yamamori T & Hashikawa T. *Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor-1a and -1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain*. 2000. *J Comp Neurol.* 416 475-495.

- Libertun C 1980 *Radioinmunoanálisis*. Buenos Aires: López Libreros Editores SRL.
- Libertun C, Arakelian MC, Larrea GA & Foglia VC. *Inhibition of prolactin secretion by GABA in female and male rats*. 1979. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 161 28-31.
- Livne I, Gibson MJ & Silverman AJ. *Biochemical differentiation and intercellular interactions of migratory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the mouse*. 1993a. *Dev.Biol.* 159 643-656.
- Livne I, Gibson MJ & Silverman AJ. *Biochemical differentiation and intercellular interactions of migratory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the mouse*. 1993b. *Dev.Biol.* 159 643-656.
- Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL & Randall RJ. *Protein measurement with Folin phenol reagent*. 1951. *Journal of Biological Chemistry* 193 265-275.
- Luderer U & Schwartz NB. *Acute changes in pulsatile LH and FSH secretion after ovariectomy in rats: treatment with oestradiol for 24 h suppresses LH, but not FSH, for at least 48 h*. 1994. *Journal of Reproduction and Fertility* 100 613-621.
- Lujan R, Shigemoto R & Lopez-Bendito G. *Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain*. 2005. *Neurosciences* 130 567-580.
- Lux-Lantos V, Becu-Villalobos D, Bianchi M, Rey-Roldán EB, Chamson-Reig A, Pignataro O & Libertun C. *GABAB receptors in anterior pituitary cells. Mechanism of action coupled to endocrine effects*. 2001. *Neuroendocrinology* 73 334-343.
- Lux-Lantos VA, Bianchi MS, Catalano PN & Libertun C. *GABA(B) Receptors in Neuroendocrine Regulation*. 2008. *Cell Mol.Neurobiol.* 28 803-817.
- Lux-Lantos VAR, Rey EB & Libertun C. *Activation of GABA B receptors in the anterior pituitary inhibits prolactin and luteinizing hormone secretion*. 1992. *Neuroendocrinology* 56 687-693.
- Macdonald RL & Olsen RW. *GABAA receptor channels*. 1994. *Annu.Rev.Neurosci.* 17 569-602.
- Maffucci JA & Gore AC 2009 Hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, edn 274, pp 69-127. Ed WJ Kwang. Burlington: Academic Press.
- Maffucci JA, Walker DM, Ikegami A, Woller MJ & Gore AC. *NMDA receptor subunit NR2b: effects on LH release and GnRH gene expression in young and middle-aged female rats, with modulation by estradiol*. 2008. *Neuroendocrinology* 87 129-141.
- Mahesh VB & Brann DW. *Regulatory role of excitatory amino acids in reproduction*. 2005. *Endocrine*. 28 271-280.
- Malven PV 2000 Neurotransmitters as Regulators of Hypothalamic Function. In *The Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, pp 59-73. Eds PM Conn & ME Freeman. New Jersey: Humana Press.
- Manzo J, Cruz MR, Hernandez ME, Pacheco P & Sachs BD. *Regulation of noncontact erection in rats by gonadal steroids*. 1999. *Horm.Behav.* 35 264-270.
- Maras PM & Petrulis A. *Anatomical connections between the anterior and posterodorsal sub-regions of the medial amygdala: integration of odor and hormone signals*. 2010. *Neurosciences* 170 610-622.
- Marshall JC & Eagleson CA. *Neuroendocrine aspects of polycystic ovary syndrome*. 1999. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 28 295-324.

- Martin C, Jacobi JS, Nava G, Jeziorski MC, Clapp C & Martinez dE. *GABA inhibition of cyclic AMP production in immortalized GnRH neurons is mediated by calcineurin-dependent dephosphorylation of adenylyl cyclase 9*. 2007. *Neuroendocrinology* 85 257-266.
- Martinez de la Escalera G, Choi AL & Weiner RI. *Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line*. 1992. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 1852-1855.
- Martinez dE, Choi AL & Weiner RI. *Biphasic gabaergic regulation of GnRH secretion in GT1 cell lines*. 1994. *Neuroendocrinology* 59 420-425.
- Martinez LA & Petrulis A. *The bed nucleus of the stria terminalis is critical for sexual solicitation, but not for opposite-sex odor preference, in female Syrian hamsters*. 2011. *Horm.Behav.* 60 651-659.
- Masco DH & Carrer HF. *Sexual receptivity in female rats after lesion or stimulation in different amygdaloid nuclei*. 1980. *Physiol Behav.* 24 1073-1080.
- Mayerhofer A, Höne-Zell B, Gamel-Didelon K, Jung H, Redecker P, Grube D, Urbanski HF, Gasnier B, Fritschy JM & Gratzl M. *Gamma-aminobutyric acid (GABA): a para- and/or autocrine hormone in the pituitary*. 2001. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 1089-1091.
- McCarthy MM, Auger AP & Perrot-Sinal TS. *Getting excited about GABA and sex differences in the brain*. 2002. *Trends Neurosci.* 25 307-312.
- McClellan KM, Calver AR & Tobet SA. *GABA(B) receptors role in cell migration and positioning within the ventromedial nucleus of the hypothalamus*. 2008. *Neurosciences* 151 1119-1131.
- Miranda LA, Strobl-Mazzulla PH, Strussmann CA, Parhar I & Somoza GM. *Gonadotropin-releasing hormone neuronal development during the sensitive period of temperature sex determination in the pejerrey fish, *Odontesthes bonariensis**. 2003. *Gen.Comp Endocrinol* 132 444-453.
- Mitsushima D, Hei DL & Terasawa E. *gamma-Aminobutyric acid is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing hormone-releasing hormone before the onset of puberty*. 1994. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 395-399.
- Mitsushima D, Tin-Tin WS & Kimura F. *Sexual dimorphism in the GABAergic control of gonadotropin release in intact rats*. 2003. *Neurosci.Res.* 46 399-405.
- Moenter SM, Chu Z & Christian CA. *Neurobiological mechanisms underlying oestradiol negative and positive feedback regulation of gonadotrophin-releasing hormone neurones*. 2009. *Journal of Neuroendocrinology* 21 327-333.
- Moenter SM, DeFazio AR, Pitts GR & Nunemaker CS. *Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion*. 2003. *Front Neuroendocrinol.* 24 79-93.
- Moenter SM & DeFazio RA. *Endogenous gamma-aminobutyric acid can excite gonadotropin-releasing hormone neurons*. 2005. *Endocrinology* 146 5374-5379.
- Moguilevsky JA & Wuttke W. *Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats*. 2001. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 109 188-195.
- Naftolin F, Garcia-Segura LM, Horvath TL, Zsarnovszky A, Demir N, Fadiel A, Leranath C, Vondracek-Klepper S, Lewis C, Chang A & Parducz A. *Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge*. 2007. *Reprod.Sci.* 14 101-116.
- Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L & Tena-Sempere M. *Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic*

- acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide.* 2004. *Endocrinology* 145 4565-4574.
- Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK & Steiner RA. *Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse.* 2009. *J Neurosci.* 29 11859-11866.
- Neal-Perry G, Lebesgue D, Lederman M, Shu J, Zeevalk GD & Etgen AM. *The excitatory peptide kisspeptin restores the luteinizing hormone surge and modulates amino acid neurotransmission in the medial preoptic area of middle-aged rats.* 2009. *Endocrinology* 150 3699-3708.
- Oberto A, Panzica GC, Altruda F & Eva C. *GABAergic and NPY-Y(1) network in the medial amygdala: a neuroanatomical basis for their functional interaction.* 2001. *Neuropharmacology* 41 639-642.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O & Fujino M. *Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor.* 2001. *Nature* 411 613-617.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V & Mungenast AE. *Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach?* 2006. *Endocrinology* 147 1166-1174.
- Ojeda SR, Prevot V, Heger S, Lomniczi A, Dziedzic B & Mungenast A. *The neurobiology of female puberty.* 2003. *Horm.Res.* 60 Suppl 3 15-20.
- Okamoto T, Sekiyama N, Otsu M, Shimada Y, Sato A, Nakanishi S & Jingami H. *Expression and purification of the extracellular ligand binding region of metabotropic glutamate receptor subtype 1.* 1998. *J Biol Chem* 273 13089-13096.
- Otero Losada ME. *Acute stress and GABAergic function in the rat brain.* 1989. *Br.J.Pharmacol.* 96 507-512.
- Page RB 1988 *The Anatomy of the Hypothalamo-Hypophyseal Complex.* In *The Physiology of Reproduction.*, pp 1161-1233. Eds E Knobil & JD Neill. New York: Raven Press.
- Palkovits M 2000 *Micro- and Macroscopic Structure, Innervation and Vasculature of the Hypothalamus.* In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, pp 23-40. Eds PM Conn & ME Freeman. New Jersey: Humana Press.
- Paredes RG & Baum MJ. *Role of the medial preoptic area/anterior hypothalamus in the control of masculine sexual behavior.* 1997. *Annu.Rev.Sex Res.* 8 68-101.
- Parent AS, Matagne V & Bourguignon JP. *Control of puberty by excitatory amino acid neurotransmitters and its clinical implications.* 2005. *Endocrine.* 28 281-286.
- Parfitt DB & Newman SW. *Fos-immunoreactivity within the extended amygdala is correlated with the onset of sexual satiety.* 1998. *Horm.Behav.* 34 17-29.
- Parhar IS. *Cell migration and evolutionary significance of GnRH subtypes.* 2002. *Prog.Brain Res.* 141 3-17.
- Park MK & Wakabayashi K. *Preparation of a monoclonal antibody to common amino acid sequence of LHRH and its application.* 1986. *Endocrinol.Jpn.* 33 257-272.
- Pau KY, Hess DL, Kohama S, Bao J, Pau CY & Spies HG. *Oestrogen upregulates noradrenaline release in the mediobasal hypothalamus and tyrosine hydroxylase gene expression in the brainstem of ovariectomized rhesus macaques.* 2000. *J Neuroendocrinol.* 12 899-909.

- Paulsen RE, Odden E & Fonnum F. *Importance of glutamine for gamma-aminobutyric acid synthesis in rat neostriatum in vivo*. 1988. *Journal of Neurochemistry* 51 1294-1299.
- Paxinos G, Halliday G, Watson C, Koutcherov Y & Wang HQ 2007 Atlas of the developing mouse brain at E17.5, P0, and P6. In Amsterdam: Academic Press.
- Perrin G, Meurisse M & Levy F. *Inactivation of the medial preoptic area or the bed nucleus of the stria terminalis differentially disrupts maternal behavior in sheep*. 2007. *Horm.Behav.* 52 461-473.
- Petersen SL, Ottem EN & Carpenter CD. *Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol*. 2003. *Biology of Reproduction* 69 1771-1778.
- Pfaff T, Malitschek B, Kaupmann K, Prézeau L, Pin J-P, Bettler B & Karschin A. *Alternative splicing generates a novel isoform of the rat metabotropic GABA_BR1 receptor*. 1999. *Eur.J.Neurosci.* 11 2874-2882.
- Pfaffl MW. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. 2001. *Nucleic Acids Res.* 29 e45.
- Pielecka-Fortuna J, Chu Z & Moenter SM. *Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol*. 2008. *Endocrinology* 149 1979-1986.
- Pielecka-Fortuna J & Moenter SM. *Kisspeptin increases gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an estradiol-dependent manner*. 2010. *Endocrinology* 151 291-300.
- Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP & Tena-Sempere M. *Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms*. 2012. *Physiol Rev.* 92 1235-1316.
- Plant TM & Ramaswamy S. *Kisspeptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the rhesus monkey (Macaca mulatta)*. 2009. *Peptides.* 30 67-75.
- Plant TM, Ramaswamy S & Dipietro MJ. *Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (Macaca mulatta) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges*. 2006. *Endocrinology* 147 1007-1013.
- Pleau JM, Esling A, Geutkens S, Dardenne M & Homo-Delarche F. *Pancreatic hormone and glutamic acid decarboxylase expression in the mouse thymus: a real-time PCR study*. 2001. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 283 843-848.
- Pleil KE, Lopez A, McCall N, Jijon AM, Bravo JP & Kash TL. *Chronic stress alters neuropeptide Y signaling in the bed nucleus of the stria terminalis in DBA/2J but not C57BL/6J mice*. 2012. *Neuropharmacology* 62 1777-1786.
- Pocock G & Richards CD 2002 *Fisiologia humana, la base de la medicina*.
- Poling MC & Kauffman AS. *Organizational and activational effects of sex steroids on kisspeptin neuron development*. 2012a. *Front Neuroendocrinol.*
- Poling MC & Kauffman AS. *Sexually dimorphic testosterone secretion in prenatal and neonatal mice is independent of kisspeptin-Kiss1r and GnRH signaling*. 2012b. *Endocrinology* 153 782-793.
- Poling MC, Kim J, Dhamija S & Kauffman AS. *Development, sex steroid regulation, and phenotypic characterization of RFamide-related peptide (Rfrp) gene expression and RFamide receptors in the mouse hypothalamus*. 2012. *Endocrinology* 153 1827-1840.

- Prosser HM, Gill CH, Hirst WD, Grau E, Robbins M, Calver A, Soffin EM, Farmer CE, Lanneau C, Gray J, Schenck E, Warmerdam BS, Clapham C, Reavill C, Rogers DC, Stean T, Upton N, Humphreys K, Randall A, Geppert M, Davies CH & Pangalos MN. *Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in GABA(B1)-deficient mice*. 2001. *Mol Cell Neurosci*. 17 1059-1070.
- Quadros PS, Goldstein AY, De Vries GJ & Wagner CK. *Regulation of sex differences in progesterone receptor expression in the medial preoptic nucleus of postnatal rats*. 2002a. *J Neuroendocrinol*. 14 761-767.
- Quadros PS, Pfau JL, Goldstein AY, De Vries GJ & Wagner CK. *Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation*. 2002b. *Endocrinology* 143 3727-3739.
- Rajendren G & Moss RL. *The role of the medial nucleus of amygdala in the mating-induced enhancement of lordosis in female rats: the interaction with luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system*. 1993. *Brain Research* 617 81-86.
- Ray D & Melmed S. *Pituitary cytokine and growth factor expression and action*. 1997. *Endocrine Review* 18 206-228.
- Rey-Roldán EB, Lux-Lantos VAR, Gonzalez Iglesias A, Becu-Villalobos D & Libertun C. *Baclofen, a Gamma-aminobutyric acid B agonist, modifies hormonal secretion in pituitary cells from infantile female rats*. 1996. *Life Sciences* 58 1059-1065.
- Rice S, Ojha K, Whitehead S & Mason H. *Stage-specific expression of androgen receptor, follicle-stimulating hormone receptor, and anti-Mullerian hormone type II receptor in single, isolated, human preantral follicles: relevance to polycystic ovaries*. 2007. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 92 1034-1040.
- Richard N, Galmiche G, Corvaisier S, Caraty A & Kottler ML. *KISS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone*. 2008. *Journal of Neuroendocrinology* 20 381-393.
- Richter TA & Terasawa E. *Neural mechanisms underlying the pubertal increase in LHRH release in the rhesus monkey*. 2001. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12 353-359.
- Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L & Tena-Sempere M. *New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function*. 2008. *Front Neuroendocrinol*. 29 48-69.
- Robertson JL, Clifton DK, de la Iglesia HO, Steiner RA & Kauffman AS. *Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge*. 2009. *Endocrinology* 150 3664-3671.
- Robinson JA & Goy RW 1986 *Steroid Hormones and the Ovarian Cycle*. In *Comparative Primate Biology*, pp 63-91. Ed Alan R. Liss, Inc.
- Roselli CE, Abdelgadir SE & Resko JA. *Regulation of aromatase gene expression in the adult rat brain*. 1997. *Brain Res.Bull*. 44 351-357.
- Roselli CE & Klosterman SA. *Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effects of perinatal steroid exposure*. 1998. *Endocrinology* 139 3193-3201.
- Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, Pineda R, Gottsch ML, Tena-Sempere M, Moenter SM, Terasawa E, Clarke IJ, Steiner RA & Millar RP. *Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation*. 2009. *J Neurosci*. 29 3920-3929.
- Rudolph U, Crestani F & Mohler H. *GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions*. 2001. *Trends Pharmacol Sci*. 22 188-194.

- Sadrkhanloo R, Hofeditz C & Erickson GF. *Evidence for widespread atresia in the hypophysectomized estrogen-treated rat*. 1987. *Endocrinology* 120 146-155.
- Sajdyk T, Johnson P, Fitz S & Shekhar A. *Chronic inhibition of GABA synthesis in the bed nucleus of the stria terminalis elicits anxiety-like behavior*. 2008. *J Psychopharmacol*. 22 633-641.
- Saller CF & Czupryna MJ. *γ -Aminobutyric acid, glutamate, glycine and taurine analysis using reversed-phase high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection of dansyl chloride derivatives*. 1989. *Journal of Chromatography* 487 167-172.
- Schally A, Arimura A, Baba Y, Nair R & Matsuo Jyc. *Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone*. 1971. *Biochemical Biophysical Research Communication* 43 393.
- 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 AL, Vigouret J, Pozza M, Kelly PH, Mosbacher J, Froestl W, Kaslin E, Korn R, Bischoff S, Kaupmann K, van der Putten H & Bettler B. *Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1)*. 2001. *Neuron* 31 47-58.
- Schwanzel-Fukuda M. *Origin and migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mammals*. 1999. *Microsc.Res.Tech.* 44 2-10.
- Schwartz GA, Raitcheva D, Bless EP, Ackerman SL & Tobet S. *Netrin 1-mediated chemoattraction regulates the migratory pathway of LHRH neurons*. 2004. *Eur.J.Neurosci.* 19 11-20.
- Schwartz J, Van de PS, Clarke I, Rao A, Ray D & Vrana K. *Paracrine interactions within the pituitary gland*. 1998. *Annals New York Academy of Sciences* 839 239-243.
- Schwarz DA, Barry G, Eliasof SD, Petroski RE, Conlon PJ & Maki RA. *Characterization of γ -aminobutyric acid receptor $GABA_{B(1e)}$, a $GABA_{B(1)}$ splice variant encoding a truncated receptor*. 2000. *Journal of Biological Chemistry* 275 32174-32181.
- Schwarz JM & McCarthy MM. *Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal*. 2008a. *Journal of Neurochemistry* 105 1561-1572.
- Schwarz JM & McCarthy MM. *The role of neonatal NMDA receptor activation in defeminization and masculinization of sex behavior in the rat*. 2008b. *Horm.Behav.* 54 662-668.
- Schwarz JM, Nugent BM & McCarthy MM. *Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span*. 2010. *Endocrinology* 151 4871-4881.
- Schwirtlich M, Emri Z, Antal K, Mate Z, Katarova Z & Szabo G. *GABAA and GABAB receptors of distinct properties affect oppositely the proliferation of mouse embryonic stem cells through synergistic elevation of intracellular Ca²⁺*. 2010. *FASEB J.* 24 1218-1228.
- Searles RV, Yoo MJ, He JR, Shen WB & Selmanoff M. *Sex differences in GABA turnover and glutamic acid decarboxylase (GAD(65) and GAD(67)) mRNA in the rat hypothalamus*. 2000. *Brain Research* 878 11-19.
- Seiler N. *On the role of GABA in vertebrate polyamine metabolism*. 1980. *Physiol Chem Phys.* 12 411-429.
- Semaan SJ, Dhamija S, Kim J, Ku EC & Kauffman AS. *Assessment of epigenetic contributions to sexually-dimorphic kiss1 expression in the anteroventral periventricular nucleus of mice*. 2012. *Endocrinology* 153 1875-1886.
- Semaan SJ, Murray EK, Poling MC, Dhamija S, Forger NG & Kauffman AS. *BAX-dependent and BAX-independent regulation of Kiss1 neuron development in mice*. 2010. *Endocrinology* 151 5807-5817.

- Seminara SB, Dipietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF, Jr. & Plant TM. *Continuous human metastatin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (Macaca mulatta): a finding with therapeutic implications.* 2006. *Endocrinology* 147 2122-2126.
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinoof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA & Colledge WH. *The GPR54 gene as a regulator of puberty.* 2003. *N.Engl.J.Med.* 349 1614-1627.
- Serova L, Rivkin M, Nakashima A & Sabban EL. *Estradiol stimulates gene expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in rat locus coeruleus.* 2002. *Neuroendocrinology* 75 193-200.
- Setchell BP, Maddocks S & Brooks DE 1994 Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In *The physiology of reproduction*, edn 2nd, pp 189-221. Eds E Knobil & JD Neill. New York: Raven Press.
- Shank RP, Bennett GS, Freytag SO & Campbell GL. *Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools.* 1985. *Brain Research* 329 364-367.
- Sheikh SN, Martin SB & Martin DL. *Regional distribution and relative amounts of glutamate decarboxylase isoforms in rat and mouse brain.* 1999. *Neurochemistry International* 35 73-80.
- Silverman A & Pickard G 1983 The Hypothalamus. In *Chemical Neuroanatomy*, Ed P Emson. New York: Raven Press.
- Silverman AJ, Jhamandas J & Renaud LP. *Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence.* 1987. *J Neurosci.* 7 2312-2319.
- Simerly RB. *Hormonal control of the development and regulation of tyrosine hydroxylase expression within a sexually dimorphic population of dopaminergic cells in the hypothalamus.* 1989. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 6 297-310.
- Simerly RB. *Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways.* 1990. *Trends Neurosci.* 13 104-110.
- Simerly RB. *Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways.* 1998. *Behav.Brain Res.* 92 195-203.
- Simerly RB. *Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain.* 2002. *Annu Rev Neurosci.* 25 507-536.
- Simerly RB, Swanson LW & Gorski RA. *The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism.* 1985. *Brain Research* 330 55-64.
- Simmons DA & Yahr P. *GABA and glutamate in mating-activated cells in the preoptic area and medial amygdala of male gerbils.* 2003. *J Comp Neurol.* 459 290-300.
- Sinchak K, Dewing P, Ponce L, Gomez L, Christensen A, Berger M & Micevych P. *Modulation of the arcuate nucleus-medial preoptic nucleus lordosis regulating circuit: a role for GABAB receptors.* 2013. *Horm.Behav.* 64 136-143.
- Sliwowska JH, Billings HJ, Goodman RL & Lehman MN. *Immunocytochemical colocalization of GABA-B receptor subunits in gonadotropin-releasing hormone neurons of the sheep.* 2006. *Neurosciences* 141 311-319.

- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK & Steiner RA. *Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse*. 2005a. *Endocrinology* 146 3686-3692.
- Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK & Steiner RA. *Differential regulation of Kiss-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse*. 2005b. *Endocrinology* 146 2976-2984.
- Smith MS, Freeman ME & Neill JD. *The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy*. 1975. *Endocrinology* 96 219-226.
- Sotomayor-Zarate R, Araya KA, Pereira P, Blanco E, Quiroz G, Pozo S, Carreno P, Andres ME, Forray MI & Gysling K. *Activation of GABA-B receptors induced by systemic amphetamine abolishes dopamine release in the rat lateral septum*. 2010. *J Neurochem*. 114 1678-1686.
- Stojilkovic SS, Krsmanovic LZ, Spergel DJ & Catt KJ. *Gonadotropin- Releasing Hormone Neurons. Intrinsic pulsatility and receptor mediated regulation*. 1994. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 5 201-208.
- Takumi K, Iijima N, Iwata K, Higo S & Ozawa H. *The effects of gonadal steroid manipulation on the expression of Kiss1 mRNA in rat arcuate nucleus during postnatal development*. 2012. *J Physiol Sci* 62 453-460.
- Takumi K, Iijima N & Ozawa H. *Developmental changes in the expression of kisspeptin mRNA in rat hypothalamus*. 2011. *J.Mol.Neurosci*. 43 138-145.
- Tasan RO, Bukovac A, Peterschmitt YN, Sartori SB, Landgraf R, Singewald N & Sperk G. *Altered GABA transmission in a mouse model of increased trait anxiety*. 2011. *Neurosciences* 183 71-80.
- Terasawa E. *Control of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generation in nonhuman primates*. 1995. *Cell Mol.Neurobiol*. 15 141-164.
- Tobet S, Knoll JG, Hartshorn C, Aurand E, Stratton M, Kumar P, Searcy B & McClellan K. *Brain sex differences and hormone influences: a moving experience?* 2009. *Journal of Neuroendocrinology* 21 387-392.
- Tobet SA, Bless EP & Schwarting GA. *Developmental aspect of the gonadotropin-releasing hormone system*. 2001. *Mol.Cell Endocrinol*. 185 173-184.
- Tobet SA, Chickering TW, King JC, Stopa EG, Kim K, Kuo-Leblank V & Schwarting GA. *Expression of gamma-aminobutyric acid and gonadotropin-releasing hormone during neuronal migration through the olfactory system*. 1996. *Endocrinology* 137 5415-5420.
- Tobet SA & Schwarting GA. *Minireview: recent progress in gonadotropin-releasing hormone neuronal migration*. 2006. *Endocrinology* 147 1159-1165.
- Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, Gurbuz F, Temiz F, Millar RP & Yuksel B. *Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism*. 2012. *N.Engl.J Med*. 366 629-635.
- Tovar S, Vazquez MJ, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Vigo E, Roa J, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C & Tena-Sempere M. *Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats*. 2006. *Endocrinology* 147 2696-2704.
- Tresguerres JAF 1992 *Fisiología Humana*. Madrid: Interamericana- McGraw-Hill.
- Tsai ML, Shen B & Leung LS. *Seizures induced by GABA(B)-receptor blockade in early-life induced long-term GABA(B) receptor hypofunction and kindling facilitation*. 2008. *Epilepsy Res*. 79 187-200.

- Tu H, Rondard P, Xu C, Bertaso F, Cao F, Zhang X, Pin JP & Liu J. *Dominant role of GABAB2 and Gbetagamma for GABAB receptor-mediated-ERK1/2/CREB pathway in cerebellar neurons*. 2007. *Cell Signal*. 19 1996-2002.
- Urbanski HF, Kim SO & Connolly ML. *Influence of photoperiod and 6-methoxybenzoxazinone on the reproductive axis of inbred LSH/Ss Lak male hamsters*. 1990. *Journal of Reproduction and Fertility* 90 157-163.
- Vanhoose AM, Emery M, Jimenez L & Winder DG. *ERK activation by G-protein-coupled receptors in mouse brain is receptor identity-specific*. 2002. *J Biol Chem* 277 9049-9053.
- Varju P, Katarova Z, Madarasz E & Szabo G. *GABA signalling during development: new data and old questions*. 2001. *Cell Tissue Research* 305 239-246.
- Veldhuis JD & Johnson ML. *Cluster analysis: a simple, versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection*. 1986. *Am.J.Physiol* 250 E486-E493.
- Ventura-Silva AP, Pego JM, Sousa JC, Marques AR, Rodrigues AJ, Marques F, Cerqueira JJ, Almeida OF & Sousa N. *Stress shifts the response of the bed nucleus of the stria terminalis to an anxiogenic mode*. 2012. *Eur J Neurosci*. 36 3396-3406.
- Vidal RL, Ramirez A, Castro M, Concha II & Couve A. *Marlin-1 is expressed in testis and associates to the cytoskeleton and GABAB receptors*. 2008. *J.Cell Biochem*. 103 886-895.
- Vincent SR, Hokfelt T & Wu JY. *GABA neuron systems in hypothalamus and the pituitary gland*. 1982. *Neuroendocrinology* 34 117-125.
- Virmani MA, Stojilkovic SS & Catt KJ. *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*. 1990. *Endocrinology* 126 2499-2505.
- Waagepetersen HS, Sonnewald U & Schousboe A. *The GABA Paradox: multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent*. 1999. *Journal of Neurochemistry* 73 1335-1342.
- Wagner CK. *Progesterone receptors and neural development: a gap between bench and bedside?* 2008. *Endocrinology* 149 2743-2749.
- Walker DM, Kirson D, Perez LF & Gore AC. *Molecular Profiling of Postnatal Development of the Hypothalamus in Female and Male Rats*. 2012. *Biol.Reprod*.
- Wang X, Sun W, Zhu X, Li L, Wu X, Lin H, Zhu S, Liu A, Du T, Liu Y, Niu N, Wang Y & Liu Y. *Association between the gamma-aminobutyric acid type B receptor 1 and 2 gene polymorphisms and mesial temporal lobe epilepsy in a Han Chinese population*. 2008. *Epilepsy Res*. 81 198-203.
- Waters KM, Safe S & Gaido KW. *Differential gene expression in response to methoxychlor and estradiol through ERalpha, ERbeta, and AR in reproductive tissues of female mice*. 2001. *Toxicol.Sci*. 63 47-56.
- Wei K, Eubanks JH, Francis J, Jia Z & Snead OC, III. *Cloning and tissue distribution of a novel isoform of the rat GABA(B)R1 receptor subunit*. 2001. *Neuroreport* 12 833-837.
- White J, Wise A, Main M, Green A, Fraser N, Disney G, Barnes A, Emson P, Foord S & Marshall F. *Heterodimerization is required for the formation of a functional GABAB receptor*. 1998. *Nature* 396 679-682.
- Wierman ME, Kiseljak-Vassiliades K & Tobet S. *Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron migration: initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function*. 2011. *Front Neuroendocrinol*. 32 43-52.

- Wierman ME, Pawlowski JE, Allen MP, Xu M, Linseman DA & Nielsen-Preiss S. *Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone neuronal migration*. 2004. Trends Endocrinol.Metab 15 96-102.
- Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchinson J, Plant T, Belchetz P & Knobil E. *Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the Rhesus monkey*. 1981. Endocrinology 109 376-385.
- Wilson RI & Laurent G. *Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the Drosophila antennal lobe*. 2005. Journal of Neuroscience 25 9069-9079.
- Wirsig-Wiechmann CR & Wiechmann AF. *The prairie vole vomeronasal organ is a target for gonadotropin-releasing hormone*. 2001. Chem.Senses 26 1193-1202.
- Wolfe CA, Van Doren M, Walker HJ, Seney ML, McClellan KM & Tobet SA. *Sex differences in the location of immunohistochemically defined cell populations in the mouse preoptic area/anterior hypothalamus*. 2005. Brain Res.Dev.Brain Res. 157 34-41.
- Woodruff TK, Lyon RJ, Hansen SE, Rice GC & Mather JP. *Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis*. 1990. Endocrinology 127 3196-3205.
- Wray S. *Development of luteinizing hormone releasing hormone neurones*. 2001. Journal of Neuroendocrinology 13 3-11.
- Wu TJ, Gibson MJ, Rogers MC & Silverman AJ. *New observations on the development of the gonadotropin-releasing hormone system in the mouse*. 1997. J Neurobiol. 33 983-998.
- Xu HY, Liu YJ, Xu MY, Zhang YH, Zhang JX & Wu YJ. *Inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis suppresses the innate fear responses of rats induced by the odor of cat urine*. 2012a. Neurosciences 221 21-27.
- Xu Z, Kaga S, Mochiduki A, Tsubomizu J, Adachi S, Sakai T, Inoue K & Adachi AA. *Immunocytochemical localization of kisspeptin neurons in the rat forebrain with special reference to sexual dimorphism and interaction with GnRH neurons*. 2012b. Endocr.J 59 161-171.
- Yalcin O. *Genes and molecular mechanisms involved in the epileptogenesis of idiopathic absence epilepsies*. 2012. Seizure. 21 79-86.
- Yeo SH & Herbison AE. *Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain*. 2011. Endocrinology 152 2387-2399.
- Yu KL, Sherwood NM & Peter RE. *Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (Carassius auratus)*. 1988. Peptides. 9 625-630.
- Zhang C, Bosch MA, Ronnekleiv OK & Kelly MJ. *Gamma-aminobutyric acid B receptor mediated inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons is suppressed by kisspeptin-G protein-coupled receptor 54 signaling*. 2009. Endocrinology 150 2388-2394.