

EFFECTO DE LA ACTIVACION GABAERGICA SOBRE LA MADURACION SEXUAL EN RATAS HEMBRAS PERIPUBERALES*

CARLOS FELEDER, MARINA GUINZBURG, WOLFGANG WUTTKE*, JAIME A. MOGUILVSKY, PABLO ARIAS

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; * Abteilung Experimentelle Endokrinologie, Frauenklinik der Universität Göttingen, Alemania

Resumen Evaluamos 1) el efecto del tratamiento prolongado (días 23-29 postnatales) con ácido aminoacético (AAOA) sobre el desarrollo puberal en ratas hembra; este tratamiento aumentó el contenido de GABA ($p < 0.002$), disminuyendo el de GnRH y glutamato ($p < 0.05$ y < 0.02) en hipotálamo. La LH ($p < 0.05$) y el estradiol ($p < 0.005$) séricos cayeron. La apertura vaginal fue a los 30.8 ± 0.6 días en los controles, y a los 36.7 ± 0.98 días en las tratadas ($p < 0.0001$). 2) A los 30 días, el tratamiento agudo con AOA redujo la liberación *ex vivo* de GnRH y de glutamato, aumentando la de taurina. Este efecto fue similar al observado agregando al medio agonistas GABA-A y B. Conclusiones: la activación peripuberal del sistema GABAérgico frena el eje reproductor, produciendo un retraso en el desarrollo. Esto podría atribuirse a la existencia, en esta etapa, de interrelaciones fisiológicas entre los aminoácidos que regulan la secreción de GnRH (GABA, glutamato, taurina).

Abstract *Effect of the GABAergic system on the pubertal development of female rats.* We evaluated, in immature female rats, the effect of the GABAergic system on the reproductive axis and on pubertal development. Initially, using a prolonged treatment with aminooxyacetic acid (AOAA), increasing hypothalamic GABA ($p < 0.002$), and decreasing GnRH and glutamate content ($p < 0.05$ and < 0.02). Treated rats showed diminished serum LH ($p < 0.05$) and estradiol ($p < 0.005$) levels. Vaginal opening occurred at 30.8 ± 0.6 days in controls, and at 36.7 ± 0.98 days in AOAA-treated rats. Acute treatment with AOAA resulted in a decreased GnRH and glutamate output, and in an increased taurine release from superfused hypothalamic fragments. This effect was mimicked by the GABA-A and GABA-B agonists. The activation of the GABAergic system during postnatal days 23-29 significantly restrains the hypothalamo-pituitary-ovarian axis and delays the onset of puberty. The existence of a physiological cross-talk between excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters regulating GnRH release during the onset of puberty is postulated.

Key words: GABA, LHRH, LH, glutamato, taurina, desarrollo puberal

En los mamíferos, los neurotransmisores aminoácidos (AANT), tales como el glutamato (GLU), la taurina (TAU) y el ácido γ -aminobutírico (GABA), participan de la regulación de la secreción de gonadotropinas y de su factor liberador (GnRH), dirigiendo así la función reproductora¹. Numerosos experimentos han demostrado, además, que el GABA está involucrado en el control de la maduración sexual en la rata hembra: han sido descritas, interacciones entre el GABA y otros sistemas de neurotransmisión en el hipotálamo de animales inmaduros y adultos, y se ha propuesto que éstos mecanismos podrían participar en la regulación de secreción de GnRH, y, asimismo, en el desarrollo sexual^{1, 6}. Tomando estos hechos en consideración, se diseñaron experimentos para

evaluar, en ratas hembra: 1) el efecto de la activación crónica del sistema GABAérgico sobre el desarrollo puberal, y 2) los mecanismos de neurotransmisión por AANT involucrados en este efecto.

Material y métodos

Animales: Usamos ratas Wistar hembras inmaduras (23-30 días de edad).

Drogas: Se utilizaron agonistas GABA-A y -B (muscimol y baclofen), AAOA, GnRH (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA).

Tratamiento de AAOA crónico: Entre los días 23 y 29 de vida, los animales recibieron AAOA ($n=19$, 10 mg/kg i.p.); un grupo (CONTROL, $n=18$) fue tratado con una solución de ácido acético diluida. En el día 30 postnatal, decapitamos 9 animales AAOA y 8 CONTROLES. Se recolectó sangre para determinación de LH y estradiol. Disecamos, con ayuda de un estereomicroscopio, el hipotálamo anterior y mediobasal (AMBH), que fue homogeneizado en 400 μ l de ácido perclórico 0.4 N y centrifugado, para dosar luego GnRH y AANT en el sobrenadante. Los ovarios fueron disecados y pesados. A los animales restantes ($n=10$ /grupo) se los observó periódicamente hasta que la apertura vaginal (AV) tuvo lugar.

* Este trabajo mereció el Premio Montuori instituido por la Fundación Gador y otorgado por la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE) durante su reunión anual en Mar del Plata en noviembre 1999

Tratamiento agudo con AAOA: 20 animales de 30 días de edad recibieron AAOA (30 mg/kg i.p.) o una cantidad equimolar de ácido acético (CONTROLES-n = 20). Una hora después los animales fueron decapitados, y disecamos fragmentos de AMBH, que fueron colocados inmediatamente en cámaras de 200 µl (n=2/cámara), bañados con EBSS (solución de Earles) con un flujo de 40 µl/min. Se obtuvieron 9 fracciones (durante 135 min) guardándose los efluentes a -30°C.

Perifusión con muscimol y baclofen: Fragmentos de AMBH obtenidos en forma similar fueron perifundidos con EBSS durante 60 min (descarga basal). Entre los 60 y los 120 min, agregamos muscimol o baclofen (1 µM) al medio de perifusión⁶. Fueron realizados en paralelo experimentos control (sin agonistas GABAérgicos, n=10).

Métodos analíticos y estadísticos: Las concentraciones de LH y estradiol se determinaron en duplicado por RIA. Medimos GLU, TAU y GABA tras la derivatización con fenilisotiocianato, mediante HPLC-RP y detección UV a 254 nm⁷. Los resultados se presentan como promedio ± SEM. Se estimaron las diferencias entre los grupos usando la prueba exacta de Fisher y un ANOVA, seguido por el t test múltiple de Bonferroni. Una p < 0.05 fue considerada significativa.

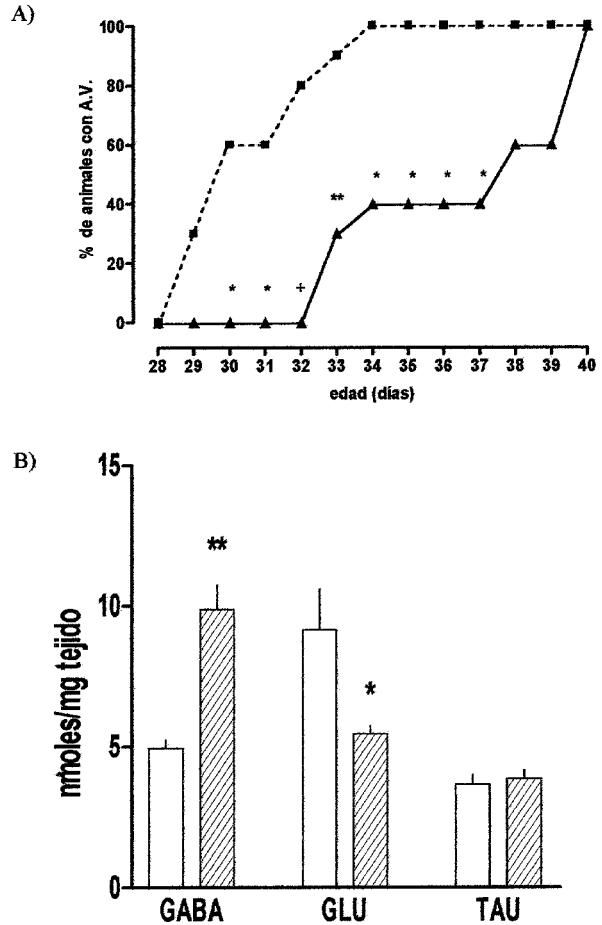
Resultados

El tratamiento prolongado con AAOA i.p. duplicó las concentraciones hipotalámicas de GABA; se observó además una disminución significativa en el contenido de GLU, mientras que las concentraciones de TAU permanecieron inalteradas (Fig. 1). En el suero se observó una disminución de LH y estradiol, y el peso ovárico disminuyó significativamente (Fig. 1). La AV se retrasó significativamente: 30.8 ± 0.6 días en los controles (rango: 29-34 días), y 36.7 ± 0.98 días en ratas tratadas con AAOA (rango 33-40; p < 0.0001).

Tras el tratamiento agudo con AAOA disminuyó significativamente la liberación hipotalámica de GnRH y GLU, y aumentó notablemente la de TAU y GABA. Ambos agonistas GABAérgicos disminuyeron significativamente la secreción de GnRH y GLU y aumentaron la de TAU (Fig. 2).

Discusión

El aumento de la actividad GABAérgica central por administración de AAOA durante los días postnatales 23-29 resultó en una reducción hipotalámica del contenido de GLU, y en una inhibición del eje reproductor (GnRH, LH, estradiol, peso ovárico), que llevó, en promedio, a 6 días de retraso en la AV. En forma similar, la administración aguda de AAOA inhibió la liberación de GnRH y GLU, y estimuló la de GABA y TAU. Estos efectos agudos del AAOA sobre el GnRH y los AANT fueron imitados tanto por el agonista GABA-A como por el agonista GABA-B. Este hecho sugiere que ambos subtipos de receptores de GABA podrían mediar los efectos inhibitorios del sistema GABAérgico hipotalámico sobre las neuronas GnRH. La liberación reducida de GLU observada podría contribuir a la inhibición del eje reproductor, y al retraso resultante en la AV tras la activación GABAérgica por AAOA. Se ha descrito un efecto inhibitorio de AAOA en la síntesis de GLU⁸. Así, podría atribuirse la disminución observada en el contenido

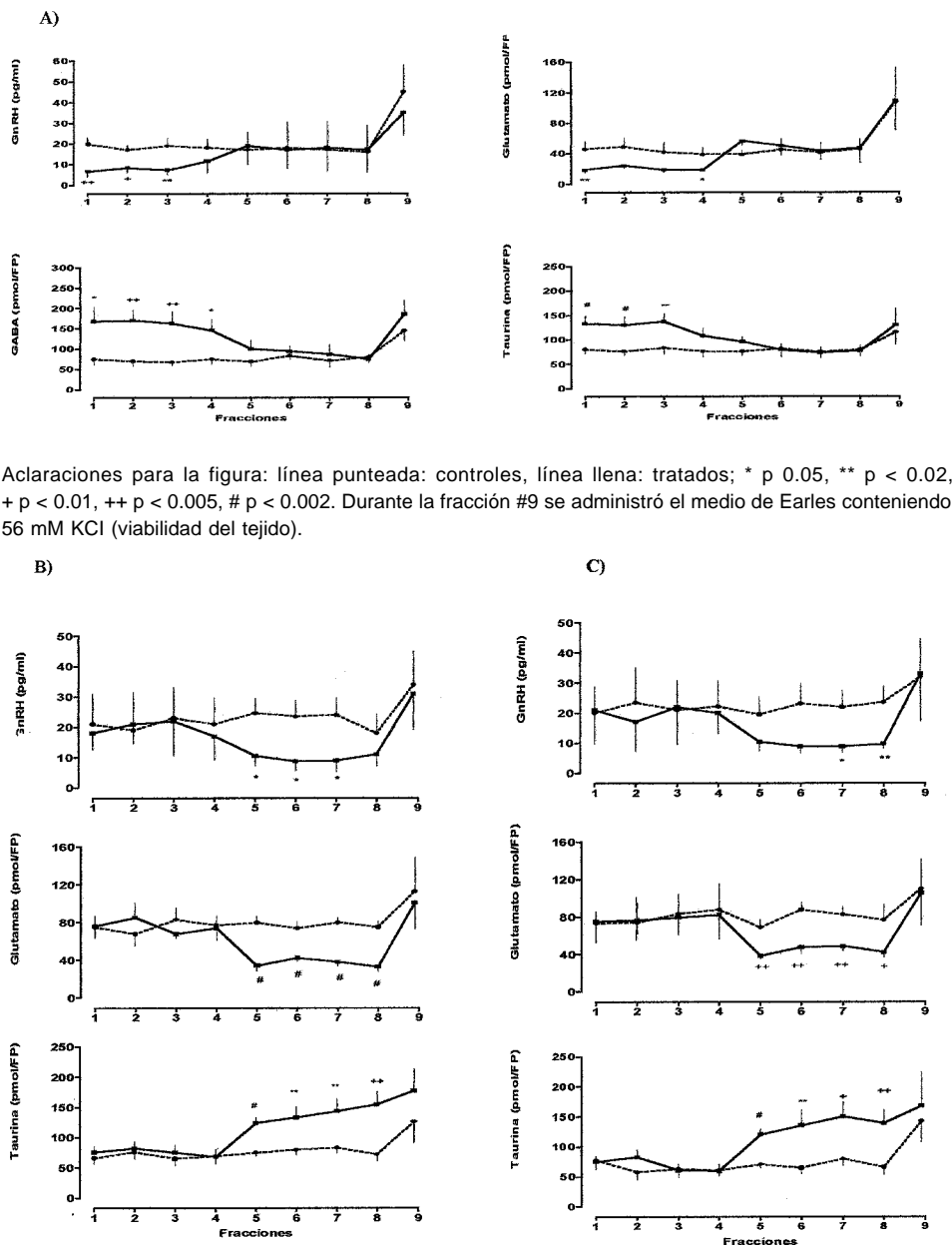


Parámetros estudiados	AAOA	Control	P
GnRH contenido hipotalámico (pg/mg tejido)	0.23 ± 0.12	4.17 ± 1.36	< 0.05
LH niveles séricos (ng/ml RP2)	0.7 ± 0.09	1.5 ± 0.03	< 0.05
Estradiol niveles séricos (pg/ml)	7.2 ± 1.4	20.3 ± 4.1	< 0.005
Peso de los ovarios (mg)	26.3 ± 5.2	60.2 ± 2.4	< 0.002

Aclaraciones para la figura: A) línea punteada: controles, línea llena: tratados; * p < 0.05, ** p < 0.02, + p < 0.01. B) barras blancas: controles, barras sombreadas:

Fig. 1.— Efecto de la administración prolongada de AAOA sobre: a) la apertura vaginal; b) el contenido hipotalámico de GABA glutamato y taurina; y c) el peso del ovario, los niveles de GnRH, LH y estradiol

de GLU a un efecto intrínseco del AAOA, probablemente actuando sobre un sistema enzimático aminotransferasa piridoxal-fosfatodependiente⁸. Sin embargo, debe destacarse que la liberación de GLU también fue inhibida por ambos agonistas GABAérgicos. Es muy probable, entonces, que la actividad GABAérgica aumentada inhiba la síntesis y la liberación de GLU.



Aclaraciones para la figura: línea punteada: controles, línea llena: tratados; * p 0.05, ** p < 0.02, + p < 0.01, ++ p < 0.005, # p < 0.002. Durante la fracción #9 se administró el medio de Earles conteniendo 56 mM KCl (viabilidad del tejido).

Fig. 2.- Efecto de la administración aguda de A) AAOA, B) muscimol y C) baclofen, sobre la liberación hipotalámica de GnRH, glutamato, taurina y GABA

Experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que, en animales prepúberes, el contenido y la liberación de TAU disminuyen antes de la pubertad^{9, 10}, y que inyecciones intracerebroventriculares repetidas de este aminoácido frenan la actividad del eje reproductor y posponen la AV¹¹. Los experimentos presentes muestran que la activación aguda del sistema GABérgico induce un aumento significativo en la liberación de TAU. Este efecto del GABA sobre la liberación de TAU ha sido descrito anteriormente en corteza y estriado de ratones en desarrollo^{12, 13}, así como en frag-

mentos hipotalámicos de ratas adultas macho⁶. El aumento de TAU podría contribuir al efecto inhibitorio ejercido por el GABA sobre la secreción de GnRH y la maduración sexual. Esta posibilidad debe tomarse con cautela, dado que el tratamiento de AAOA crónico no alteró las concentraciones de TAU.

En resumen, la activación prolongada del sistema de GABAérgico por AAOA retrasa el desarrollo sexual en ratas hembras inmaduras. Esto puede atribuirse al efecto inhibitorio directo ejercido por el GABA sobre las neuronas GnRH, actuando sobre ambos subtipos de

receptores. Es importante enfatizar, además, que la manipulación del sistema GABAérgico induce variaciones significativas de los niveles de GLU y TAU; estos cambios posiblemente contribuyan a la inhibición del eje reproductor durante la maduración sexual.

Agradecimiento: Este trabajo se realizó con la colaboración de la Comunidad Europea, la Fundación Volkswagen, y con subsidios de la Universidad de Buenos Aires y el CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas).

Bibliografía

1. Kordon C, Drouva SV, Martínez de la escalera G, et al. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin. In: E. Knobil, et al. (eds). The physiology of reproduction (2nd edition), New York, Raven Press 1994; pp 1621-83.
2. Hartman R, He J, Barraclough C. Gamma-aminobutyric-acid-A and -B receptor antagonists increase luteinizing hormone releasing hormone. Neuronal responsiveness to intracerebroventricular norepinephrine in ovariectomized estrogen-treated rats. *Endocrinology* 1990; 127: 1336-45.
3. Adler B, Crowley WR. Evidence for gamma-aminobutyric acid modulation of ovarian hormonal effects on luteinizing hormone secretion and hypothalamic catecholamine activity in the female rat. *Endocrinology* 1986; 118: 91-7.
4. Johnston GAR, Hailstone MH, Freeman CG. Baclofen stereoselective inhibition of excitant amino acid release. *J Pharm Pharmacol* 1980; 32: 230-1.
5. Donoso A, López F, Negro-Vilar A. Cross-talk between excitatory and inhibitory amino acids in the regulation of luteinizing-hormone releasing hormone secretion. *Endocrinology* 1992; 131: 1559-61.
6. Feleder C, Jarry H, Leonhardt S. The GABAergic control of gonadotropin releasing hormone secretion in male rats during sexual maturation involves effects on hypothalamic excitatory and inhibitory amino acids systems. *Neuroendocrinology* 1996; 64: 305-12.
7. Jarry H, Hirsch B, Leonhardt S. Amino acid neurotransmitter release in the preoptic area of rats during the positive feedback action of estradiol on LH release. *Neuroendocrinology* 1992; 56: 133-40.
8. Bakkelund AH, Fonnum F, Paulsen RE. evidence using in vivomicrodialysis that aminotransferase activities are important in the regulation of the pools of transmitter amino acids. *Neurochem Res* 1993; 18: 411-5.
9. Goroll D, Arias P, Wuttke W. Ontogenic changes in the hypothalamic levels of amino acid neurotransmitters in the female rat. *Develop Brain Res* 1994; 77: 183-8.
10. Goroll D, Arias P, Wuttke W. Preoptic release of amino acid neurotransmitters evaluated in peripubertal and young adult female rats by the push-pull technique. *Neuroendocrinology* 1993; 58: 11-5.
11. Arias P, Feleder C, Rodríguez M, et al. Repeated intracerebroventricular administration of taurine lowers LH levels and postpones vaginal opening in peripubertal female rats. *develop Brain Res* 1995; 85: 137-9.
12. Kontro P, Oja SS. Release of taurine, GABA and dopamine from rat striatal slices: mutual interactions and developmental aspects. *Neuroscience* 1988; 24: 49-58.
13. Kontro P, Oja SS. Taurine and GABA release from mouse cerebral cortex slices: potassium stimulation releases more taurine than GABA from developing brain. *Develop Brain Res* 1987; 37: 277-91.

[...] Yo no puedo sufrir en mi vecindad un libro mediocre; yo no leo muchos libros; el secreto de la lectura –dicen los hombres expertos– no está en leer una muchedumbre de volúmenes, sino en leer pocos, en leerlos con atención y volver a leerlos. [...]

Azorín (1873-1967)
(José Martínez Ruiz)

Tiempos y cosas: Para amigos y enemigos. Una confesión (1944). Barcelona: Salvat, 1970, p 109