



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

Título del Trabajo

*Origen y migración de las neuronas GnRH en el bovino (Bos taurus)*

Autor

Med. Vet. Soto, Andrés Telésforo

Director

Prof. Ph.D. Zuccolilli, Gustavo Oscar

Codirector

Prof. PhD. de la Sota, Rodolfo Luzbel

Lugar de trabajo

Laboratorio de Neurociencias e Instituto de Teriogenología

Miembros del Jurado

Prof. Dr. Barbeito, Claudio

Ph.D. Carri, Néstor Gabriel

Dr. Goya, Rodolfo Gustavo

17 de Agosto de 2011

*A mis hijos, Luisina, Joaquín y Emilio, a mis padres Poli y Andrés y a mi tía*

*“Tina”.*

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	VIII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	XII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XIV
<b>RESUMEN</b> .....	XVIII
<b>SUMMARY</b> .....	XIX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. El sistema GnRH: consideraciones generales .....	1
1.2. Estructura molecular de la GnRH .....	3
1.2.1. Estructura y formas moleculares de GnRH .....	3
1.2.2. Número de variantes moleculares en vertebrados .....	7
1.2.3. GnRH en tejidos extrahipotalámicos .....	10
1.2.4. Agonistas sintéticos de GnRH .....	12
1.3. Las neuronas GnRH .....	14
1.3.1. Morfología y morfometría de las neuronas GnRH .....	14
1.3.2. Localización y número de neuronas GnRH hipotalámicas .....	18
1.3.3. Distribución de las neuronas GnRH en el hipotálamo de especies no rumiantes .....	21
1.3.4. Distribución de las neuronas GnRH en el hipotálamo de rumiantes adultos .....	26

1.4. Reseña del desarrollo del sistema nervioso y de las placodas olfativas	
generales.....	29
1.4.1. Introducción.....	29
1.4.2. Formación del tubo neural.....	30
1.4.2.1. Neurulación primaria.....	30
1.4.2.2. Neurulación secundaria.....	34
1.4.2.3. Diferenciación del tubo neural.....	36
1.4.2.4. Determinación de los ejes (eje céfalocaudal y dorsoventral).....	36
1.4.3. La cresta neural.....	41
1.4.4. Desarrollo de las placodas.....	43
1.4.4.1. La placoda olfatoria.....	45
1.5. Origen y migración de las neuronas GnRH.....	49
1.5.1. Introducción Origen de las neuronas GnRH.....	49
1.5.2. Origen y migración de las neuronas GnRH en anfibios, peces y aves.....	49
1.5.3. Origen y migración de las neuronas GnRH en mamíferos.....	52
1.5.4. Origen y migración de las neuronas GnRH en mamíferos de interés productivo.....	56
1.5.5. Factores y sustancias involucrados en la migración de las neuronas GnRH.....	59
1.5.5.1. Aspectos generales.....	59
1.5.5.2. La migración desde la placoda hasta el extremo caudal de la cavidad nasal.....	60
1.5.5.3. La migración en la intersección naso-encefálica.....	64
1.5.5.4. La migración en el encéfalo.....	65

<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	67
2.1.	Objetivos.....	67
2.2.	Hipótesis .....	67
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	68
3.1.	Material biológico (embriones y fetos) .....	68
3.1.1.	Obtención de embriones, fetos y terneros.....	68
3.1.2.	Determinación de la edad embrionaria y fetal .....	69
3.1.3.	Preparación y conservación del material biológico .....	71
3.1.3.1.	Fijación y extracción del encéfalo.....	71
3.1.3.2.	Almacenamiento y criopreservación del material.....	73
3.1.3.3.	Inclusión del material.....	73
3.1.3.4.	Sección del material .....	73
3.2.	Diseño experimental.....	74
3.3.	Inmunohistoquímica .....	76
3.4.	Análisis Microscópico y Captura de imágenes.....	78
3.5.	Análisis cuantitativo de las neuronas GnRH-ir .....	78
3.6.	Análisis morfométrico de los somas GnRH-ir .....	79
3.7.	Análisis estadístico .....	79
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	80
4.1.	Aspectos generales del desarrollo del sistema GnRH de los bovinos.....	80
4.2.	Las estructuras (somas celulares y fibras) GnRH-ir en fetos bovinos de 8 semanas de gestación.....	82

4.3.	Distribución de neuronas y fibras GnRH-ir en fetos bovinos de 12 semanas de desarrollo.....	99
4.4.	Distribución de neuronas y fibras GnRH-ir en fetos bovinos de 16-18 semanas de desarrollo.....	106
4.5.	Distribución de neuronas y fibras GnRH-ir en fetos bovinos de 21-22 semanas de desarrollo.....	109
4.6.	Distribución de neuronas y fibras GnRH-ir en bovinos pre-púberes .....	110
4.7.	Cantidad y parámetros morfométricos de las neuronas GnRH-ir.....	116
4.7.1.	Número de neuronas GnRH-ir.....	116
4.7.2.	Morfometría de neuronas GnRH-ir.....	117
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>125</b>
5.1.	Consideraciones de los aspectos metodológicos empleados .....	125
5.2.	La cantidad de células GnRH-ir en las distintas semanas del desarrollo .....	131
5.3.	La morfología de las células GnRH-ir durante el desarrollo.....	132
5.4.	La migración de las neuronas GnRH-ir durante el desarrollo prenatal .....	137
5.5.	Distribución encefálica de las neuronas y fibras GnRH-ir .....	141
5.6.	Nomenclatura de las moléculas de GnRH.....	145
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>147</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>149</b>

<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>185</b>
8.1.	Soluciones.....	185
8.2.	Método de inclusión en gelatina.....	186
8.3.	Técnica de inmunohistoquímica.....	187
8.4.	Histoquímica de Nissl.....	189

## AGRADECIMIENTOS

Ha transcurrido un tiempo desde que inicie mi tesis doctoral y en el lapso de la misma tengo la gracia de tener que agradecerle a muchas personas el haberme acompañado y colaborado de diversas maneras para poder realizarla.

Quisiera agradecer a los propietarios y a los trabajadores de FRIGORINA. Me es grato recordar los mates calientes en la oficina y a los despansadores, que en la playa de faena y sin mediar palabra ubicaban con destreza el triperío en la cinta, de tal manera de facilitarme la tarea. Al Dr. J.E.B. Ostrowski quien aportó la totalidad de la documentación probatoria de la existencia del Instituto de Teriogenología de la FCV – UNLP. Al Biosignal Research Center. Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University de Japón y al Dr. Gustavo Somoza por haberme facilitado los anticuerpos. A mis compañeros de las cátedras de Reproducción y Zootecnia General, y del laboratorio de Neurociencias quienes me “bancaron” absolutamente en todo, particularmente a Vanina, Verano, Lorena, Tita, Fernanda, las “Lilis”, Vanessa, Gladys, Lucas, Marcela y al Dr. Angel Russo. Al Dr. Gastón Piazzè quien debe sufrir de hipoacusia de tanto escucharme hablar sobre mi tesis. A Joaquín Polo por su ayuda para realizar la presentación. A los Dres “Cata” Medina y “Yacaré” Crudelli. A mis amigos de siempre: Sergio, Charly, Carlitos, Eduardo, Marcelo y el Negro. A los miembros del jurado, los Dres Claudio Barbeito, Néstor Carri y Rodolfo Goya, por sus invaluable comentarios y correcciones del manuscrito. Al Dr Luzbel de La Sota por su apoyo incondicional. Finalmente, quiero agradecer a mi director, el Dr. Gustavo Zuccolilli, por la paciencia que me tuvo y el haber estado presente en los momentos más difíciles.



**LISTA DE ABREVIATURAS**

AA	aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Arg	Arginina
BB	Tampón de bloqueo (Blocking buffer)
CCK	Neuropéptido colecistoquinina
cfGnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas de pez gato (catfish)
cGnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas de pollo (chicken)
DBP	Diámetro biparietal
DLHP	Punto de visagra dorsolaterla
FBS	Suero fetal bovino (fetal bovine serum)
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Ácido gamma amino butírico
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
GnRH-ir	Hormona liberadora de gonadotrofinas inmunorreactiva
GnRHr	Receptor de la hormona liberadora de gonadotrofinas
gpGnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas de cobayo
His	Histidina
hrGnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas de arenque
Hyp	Hidroxiprolina
ID	Índice de redondez

IHQ	Inmunohistoquímica
ir	inmunorreactiva
Leu	Leucina
LCC	Largo cefalocaudal
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Factor liberador de hormona luteinizante
mGnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas mamífera
MHP	Punto de visagra medio
NGB	Célula GnRH-ir de tipo neuroblástico
NGCNa	Célula GnRH-ir de tipo bipolar de la cavidad nasal
NGE	Célula GnRH-ir de tipo bipolar en el procencéfalo secundario
NGNT	Célula GnRH-ir de tipo bipolar en la intersección naso-encefálica
PA	Placa alar
PB	Placa basal
PBS	Buffer fosfato salino
PBST	Buffer fosfato salino con tritón
PCR	Reacion en cadena de la polimerasa
pGLU	Piro-Glutamato
Phe	Fenilalanina
pjGnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas de pejerrey
Pro	Prolina
PS	Placa del suelo
PT	Placa del techo
sbGnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas en el pez dorado

Ser	Serina
sGnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas de salmón
SNP	Sistema nervioso periférico
TRF o TRH	Hormona liberadora de TSH.
Trp	Triptófano
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
Tyr	Tirosina
VNO	Órgano vomeronasal
VT	Vesícula telencefálica
wfGnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas del pez blanco

## LISTA DE TABLAS

### Tabla

1.	Composición aminoacídica de la molécula de mGnRH y análogos naturales en cordados .....	4
2.	Clasificación de las variantes moleculares de GnRH de acuerdo a su localización .....	7
3.	Distribución taxonómica de las diferentes variantes de GnRH en mamíferos y método de caracterización .....	9
4.	Secuencia aminoacídica de agonistas de GnRH1 utilizados en humanos y especies animales de interés productivo .....	13
5.	Tamaño de las neuronas GnRH-ir durante la etapa embrionaria y fetal.....	20
6.	Tamaño de las neuronas GnRH-ir en el adulto en diferentes especies de mamíferos .....	20
7.	Áreas hipotalámicas de mayor concentración de neuronas GnRH en diferentes ordenes o especies de mamíferos.....	26
8.	Moléculas que actuarían en el proceso de migración celular de las neuronas GnRH.....	62
9.	Determinación de la edad fetal en bovinos. Ecuaciones de regresión.....	70
10.	Cantidad y proporción de neuronas GnRH-ir en fetos de 8 semanas discriminados por ubicación y por días de edad gestacional.....	84
11.	Porcentaje de somas neuronales GnRH-ir en distintas edades del desarrollo y en bovinos prepúberes .....	114

12. Parámetros morfométricos de las neuronas GnRH-ir en fetos bovinos de la 8<sup>va</sup> semana de gestación (valores medios y error estándar).....121
13. Parámetros morfométricos de las neuronas GnRH-ir en fetos bovinos de la 8<sup>va</sup> semana de gestación (valores máximos y mínimos).....121
14. Morfometría de las neuronas GnRH-ir en fetos (12<sup>da</sup> - 22<sup>da</sup> semana de gestación) y bovinos pre-púberes (valores medios y error estándar) .....123
15. Morfometría de las neuronas GnRH-ir en fetos bovinos de la 12<sup>da</sup> a la 22<sup>da</sup> semana de gestación (valores medios y error estándar).....123
16. Morfometría de las neuronas GnRH-ir en fetos de la 12<sup>da</sup> a la 22<sup>da</sup> semana de gestación y bovinos pre-púberes (valores mínimos y máximos).....124

## LISTA DE FIGURAS

**Figura**

1.	Esquema del hipotálamo bovino en una sección mediana.....	1
2.	Representación esquemática de la distribución de neuronas que expresan GnRH en el cerebro de peces teleósteos (medada) los cuales poseen las tres formas parálogas de GnRH.....	6
3.	Esquema del desarrollo del disco embrionario (16-18 días de gestación) .....	29
4.	Esquema del desarrollo del disco embrionario (16-18 días de gestación) .....	32
5.	Microfotografías de microscopía electrónica de barrido (izquierda) y representación esquemática del proceso de neurulación primaria (derecha).....	35
6.	Segmento neural completo (neurómero) .....	37
7.	Representación semiesquemática del tubo neural de un embrión de gato de 18 días y 22 días .....	39
8.	Representación esquemática de la subdivisión de las vesículas cefálicas.....	40
9.	Esquema de las distintas regiones en que se subdivide la cresta neural.....	43
10.	Esquema de la evolución temprana de las placodas .....	44
11.	Representación esquemática de la cresta neural, el primordio panplacodal y la epidermis alrededor de la placa neural (A); de las placodas craneales en el estadio de 10 a 13 somitas en embrión de pollo (B); y de las placodas craneales (vista lateral) en embrión de Xenopus (C).....	45
12.	Fotografía de un embrión de ratón de 10 días .....	47
13.	Embriones y fetos recién extraídos del útero gestante procesados durante el presente trabajo.....	70

14.	Feto bovino de 11 semanas de edad gestacional .....	71
15.	Técnica de inmunohistoquímica, cubetas para la implementación del método de secciones flotantes (free floating sections) .....	75
16.	Síntesis del procedimiento de la técnica de avididina/biotina peroxidasa de inmunohistoquímica .....	77
17.	Sección horizontal de un feto de 8 semanas de desarrollo teñida con violeta de cresilo.....	80
18.	Edad del desarrollo expresado en semanas de los embriones y los fetos bovinos en relación con la presencia de elementos inmunorreactivos para el anticuerpo LHR13 (GnRH mamífera) y el cII 675 (GnRH aviar) .....	81
19.	Fotografía de la placoda olfativa de un embrión bovino de aproximadamente 25 días de edad gestacional (40X).....	81
20.	Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, en el plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático).....	88
21.	Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 150 $\mu\text{m}$ del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático).....	89
22.	Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 250 $\mu\text{m}$ del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático).....	90
23.	Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 300 $\mu\text{m}$ del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático).....	91

24.	Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 450 $\mu\text{m}$ del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático).....	92
25.	Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 500 $\mu\text{m}$ del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático).....	93
26.	Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 600 $\mu\text{m}$ del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático).....	94
27.	Reconstrucción semiesquemática de una sección sagital de la cabeza de un feto de 8 semanas de desarrollo .....	95
28.	Reconstrucción semiesquemática de una sección sagital de la cabeza de un feto de 8 semanas de desarrollo (feto 205).....	96
29.	Sección horizontal de la cabeza de un feto de 8 semanas de desarrollo.....	97
30.	Sección horizontal de la cabeza de un feto de 8 semanas de desarrollo.....	98
31.	Neuronas (A) y fibras (B) GNRHir en área hipotalámica de baja densidad celular con disposición oblicua a perpendicular con respecto al núcleo SON .....	102
32.	Secciones coronales obtenidas a partir de microfotografías del hipotálamo rostral de fetos de 12 semanas de desarrollo .....	104
33.	Secciones coronales obtenidas a partir de microfotografías del hipotálamo de fetos de 12 semanas de desarrollo .....	105
34.	Representación gráfica de las principales regiones del hipotálamo rostral de fetos de 16-18 semanas de desarrollo .....	108



35. Representación gráfica de las principales regiones del hipotálamo rostral de fetos de 21-22 semanas de desarrollo .....112
36. Representación gráfica de las principales regiones del hipotálamo rostral de animales prepúberes bovinos.....115
37. Zona inmunoreactiva (línea blanca) de la eminencia media (EM) conteniendo fibras y GNRH-ir libre en contacto con la hipófisis (HIP, 40X, A); y fibras y GNRH-ir libre en la eminencia media (EM) en contacto con los vasos sanguíneos del sistema porta hipofisiario (100X, B).....116
38. Fotografías de las células tipo neuroblásticas GnRHir (NGB) aisladas (A y B) o agrupadas (C) en el epitelio nasal de fetos bovinos de la 8<sup>va</sup> semana de edad gestacional.....119
39. Fotografías de neuronas bipolares (A) y fibras GnRHir (B) en las adyacencias del órgano vomeronasal (VNO, 200X), neuronas bipolares GnRHir (C) en el prosencéfalo fetal, sin tinción de contraste (400X), neuronas y fibras GNRHir (D) sobre el trayecto del nervio terminal en la intersección nasoencefálica e intracraneal (200X), y células (F) marcadas en la epidermis de la región frontonasal (200X).....120
40. Fotografías de neuronas GnRH.ir de fetos de 12 semanas de edad gestacional.....122

**TÍTULO** Origen y migración de las neuronas GnRH en el bovino (*Bos taurus*).

### **RESUMEN**

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es liberada por células neurosecretoras ubicadas en el hipotálamo y regula la secreción de las hormonas gonadotróficas hipofisarias, foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), es imprescindible en los procesos de esteroidogénesis y gametogénesis gonadal. Mediante la aplicación de técnicas de inmunohistoquímica con la utilización del anticuerpo monoclonal LRH13 y del anticuerpo policlonal cII 675 se caracterizaron los tipos, la migración y distribución de la población de neuronas y fibras GnRH en fetos (4<sup>ta</sup> a 22<sup>da</sup> semana de edad gestacional) y ejemplares prepúberes de bovinos (*Bos taurus*). No se hallaron inmunomarcaciones positivas al anticuerpo cII 675. La migración naso-encefálica de las neuronas GnRHir ocurrió en la 8<sup>ta</sup> semana del desarrollo fetal. Las células tipo neuroblásticas fueron detectadas en el epitelio de la cavidad nasal y del órgano vomeronasal. Estas células migran por rutas definidas por los nervios vomeronasales y nervio terminal atravesando la lámina cribada del etmoides y penetran por la intersección naso-encefálica, para ubicarse en el prosencéfalo, principalmente en el área presuntiva del POA. Durante este período las células GnRHir sufrieron cambios significativos en su morfometría. Si bien, las células y fibras GnRHir post-migración naso-encefálica se ubicaron mayoritariamente en el hipotálamo rostral, la distribución y ubicación definitiva se alcanzó en la 21-22<sup>da</sup> semana del desarrollo fetal, momento en que se considerará que culminó la migración encefálica. Las neuronas GnRHir se distribuyeron principalmente en el área septal, POA, SON y AHA y en menor medida en la región periarcuata y ARC, tanto en fetos como en los terneros. Las neuronas GnRHir fueron mayoritariamente bipolares. Se encontraron variaciones significativas en el tamaño de las neuronas fetales, y entre estas y las neuronas GnRHir de los terneros.

**PALABRAS CLAVES** Migración, neuronas, GnRH, feto, hipotálamo, bovino.

**TITLE** Origen and migration GnRH neurons in the bovine (*Bos taurus*).

**SUMMARY**

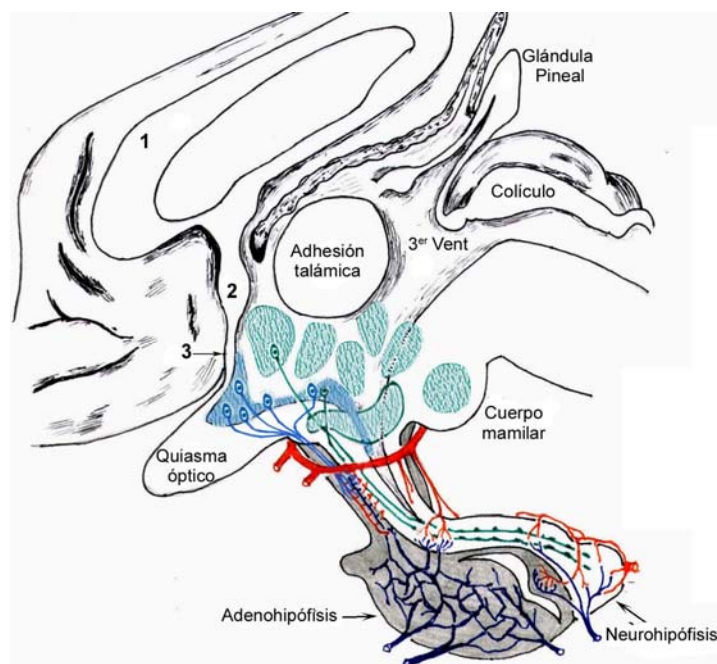
Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is released by neurosecretory cells located in the hypothalamus. It regulates the synthesis and release of the Gonadotropin pituitary hormones, such as follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), which they are essential to the processes of steroid synthesis and gamete development. Immunohistochemistry techniques were used to characterize types, migration and distribution of neurons population and GnRH fibers. A monoclonal LRH13 antibody and a polyclonal cII 675 antibody were used to label cells and fibers in foetus (4 to 22 week of gestational age) and prepubertal bovine animals (*Bos taurus*). There was no evidence of positive cells labelling to the polyclonal cII675 antibody. The naso-encephalic migration of the GnRHir neurons occurs in the 8<sup>th</sup> week of the foetal development. Neuroblastic cells types were detected in the epithelium of the nasal cavity and in the vomeronasal organ, which migrate through routes defined by the vomeronasal nerves and the terminal nerve through the cribbed sheet of the ethmoids bone. Then they penetrate to the naso-encephalic intersection to be located in the forebrain, principally in the presumptive POA area. During this period the GnRHir cells present significant morphological changes. Though, most of the cells and the GnRHir naso-encephalic post-migration fibres were located in the rostral hypothalamus, distribution and definitive location was observed in the 21-22 week of the foetal development when it is thought that the encephalic migration has ended. Both in foetuses and calves the GnRHir neurons were distributed principally in the septal area, the POA, the SON and the AHA and in less extend the periarquata and the ARC regions. Most of the GnRHir neurons were bipolar and significant variations were found in the size of the foetal neurons, and between these neurones and the GnRHir neurons of the calves.

**Keywords** Migration, neurones, GnRH, foetus, hypothalamus, bovine.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. El sistema GnRH: Consideraciones Generales

Los descubrimientos de Geoffrey Harris (1, 2) aportaron la inequívoca evidencia para reconocer que el funcionamiento de la glándula pituitaria estaba bajo el control de células ubicadas en el hipotálamo. Ambas estructuras se conectan funcionalmente por medio de un sistema vascular que comienza en los vasos portales de la eminencia media y se distribuye por medio de vasos capilares en el interior de la parte glandular de la hipófisis (Figura 1). Sin duda, el descubrimiento del eje hipotálamo-hipofisiario es uno de los hitos más importantes de la neuroendocrinología y por supuesto, representa el evento que influenció la investigación en esta disciplina por más de 40 años.



**Figura 1.** Esquema del hipo-tálamo bovino en una sección mediana. En azul aparece el sistema parvocelular con neuronas esparcidas en distintos núcleos y los axones proyectados a los vasos capilares de la eminencia media. En verde se observa el sistema magnocelular cuyos axones se dirigen hacia la neurohipófisis. Los distintos núcleos hipotalámicas se muestran formando parte de la pared del tercer ventrículo. 1- Cuerpo caloso, 2-Comisura anterior y 3- Lámina terminal. Adaptado de Zuccolilli, G (2002)

Durante varias décadas, diversos grupos de investigadores se abocaron a la identificación de las sustancias que el hipotálamo sintetiza y libera para controlar el funcionamiento de la glándula hipófisis. Schreiber y Guillermin entre los años 1958-62 aíslan el primer factor u hormona de liberación de las hormonas adenohipofisarias. Esta molécula resultó ser un tripéptido que estimula la liberación de TSH y en consecuencia recibió el nombre de hormona liberadora de TSH.

Pocos años después se presenta evidencia de la existencia de una hormona hipotalámica que induce la liberación de LH y de FSH desde la hipófisis, que se denominó originalmente hormona liberadora de LH (3, 4). Su acción dual, como factor liberador único para ambas gonadotropinas hipofisarias, determinó que después de muchos años se le cambiara el nombre a GnRH.

La GnRH es sintetizada por neuronas cuyos somas celulares se encuentran esparcidos en distintos núcleos del hipotálamo. Los axones de estas neuronas forman parte del sistema parvocelular y se dirigen hacia la eminencia media para terminar en estrecho contacto con los capilares portales. En este sitio la GnRH es liberada, en forma cíclica y tónica a la circulación portal hipofisaria para llegar a sus blancos celulares, las células adenohipofisarias gonadotrofas. En las células gonadotróficas, la GnRH se une a su receptor e inicia una serie de eventos fisiológicos que conllevan a la síntesis y liberación de las gonadotropinas. LH y FSH son liberadas a la circulación sistémica y controlan los procesos de gametogénesis y esteroideogénesis (5, 6). También, durante mucho tiempo, se ha sugerido que la GnRH tiene un rol modulador en la actividad de diversos sistemas encefálicos y en distintos órganos periféricos (7-10).

## 1.2. Estructura y formas moleculares de la GnRH

### 1.2.1. Formas moleculares de GnRH

La hormona GnRH es un decapeptido que se aisló y caracterizó por primera vez en cerdos y ovejas a principios de la década de 1970 (11-14). A comienzos de la los 80s se aisló del pollo una segunda isoforma de GnRH denominada *chicken* GnRH II (cGnRH II) (15) y una tercera isoforma de GnRH encontrada en peces teleósteos, la cual se denominó *salmon* GnRH (sGnRH) (16). Posteriormente, numerosas isoformas de GnRH fueron aisladas a partir de diferentes especies animales y fueron denominadas a partir de la primera especie de donde se aisló. Actualmente, se conocen 23 formas moleculares naturales de GnRH en los cordados que se diferencian por la secuencia de los AA que la componen (17-20). En la estructura primaria de las variantes moleculares de GnRH se distinguen AA que se encuentran conservados en su posición. De los diez AA que componen este decapeptido se conservan los de posición 1 (pGlu), 4 (Ser), 9 (Pro) y 10 (Gly.NH<sub>2</sub>). Los AA de la posición 2 (His) y de la posición 3 (Trp) se encuentran prácticamente conservados a excepción de la variante molecular *guinea pig* GnRH, en donde el AA His de la posición 2 es reemplazado por Tyr, y en dos variantes moleculares, *Lamprea-I* y *Octopus* GnRH, se encuentran cambios en la posición 3, en donde el AA Trp es sustituido por el AA Tyr en *Lamprea-I* GnRH y por el AA Phe en *Octopus* GnRH. El número de AA sustituidos puede ir de 1 a 5 en las diferentes formas moleculares y la mayor variación de AA entre los diferentes análogos naturales se da en la posición 8 y, en menor medida, en la posición 7 (Tabla 1). Las menores variaciones en la composición de los aminoácidos de los análogos naturales de GnRH se encuentra en los mamíferos (19). Se identifica una variante de mGnRH, la 9-hidroxiprolina GnRH ([Hyp<sup>9</sup>]GnRH) la cual presenta una hidroxilación en el noveno aminoácido y se encuentra presente en ratas, hámsteres y también en sapos (21, 22).

**Tabla 1.** Composición aminoacídica de la molécula de mGnRH y análogos naturales en cordados (Adaptado de Pawson, AJ. and Mc Neilly, AS. 2005; Schneider, F. *et al* 2006; Tsai, P. 2006). (18-20).

Variante molecular	AMINOACIDOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>MAMIFERA</b>										
<b>(GNRH1)</b>	<b>pGLU</b>	<b>His</b>	<b>Trp</b>	<b>Ser</b>	<b>Tyr</b>	<b>Gly</b>	<b>Leu</b>	<b>Arg</b>	<b>Pro</b>	<b>Gly.NH2</b>
Cobayo	<b>pGLU</b>	<b>Tyr</b>	Trp	Ser	Tyr	Gly	<b>Val</b>	Arg	Pro	Gly.NH2
Chicken I	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	<b>Gln</b>	Pro	Gly.NH2
Rana	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	<b>Trp</b>	Pro	Gly.NH2
Seabream	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	<b>Ser</b>	Pro	Gly.NH2
Salmon										
<b>(GnRH3)</b>	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	<b>Trp</b>	<b>Leu</b>	Pro	Gly.NH2
Whitefish	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	<b>Met</b>	<b>Asn</b>	Pro	Gly.NH2
Medaka	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>Phe</b>	Gly	Leu	<b>Ser</b>	Pro	Gly.NH2
Catfish	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>His</b>	Gly	Leu	<b>Asn</b>	Pro	Gly.NH2
Sardina	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>His</b>	Gly	Leu	<b>Ser</b>	Pro	Gly.NH2
Chicken II										
<b>(GnRH2)</b>	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>His</b>	Gly	<b>Trp</b>	<b>Tyr</b>	Pro	Gly.NH2
Dogfish	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>His</b>	Gly	<b>Trp</b>	<b>Leu</b>	Pro	Gly.NH2
Lamprea III	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>His</b>	<b>Asp</b>	<b>Trp</b>	<b>Lys</b>	Pro	Gly.NH2
Lamprea I	<b>pGLU</b>	His	<b>Tyr</b>	Ser	<b>Leu</b>	<b>Glu</b>	<b>Trp</b>	<b>Lys</b>	Pro	Gly.NH2
Octopus	pGLU	Asn	Tyr	His	<b>Phe</b>	Ser	<b>Asn</b>	Gly	<b>Trp</b>	<b>His</b>
Tunicata I	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>Asp</b>	<b>Tyr</b>	<b>Phe</b>	<b>Lys</b>	Pro	Gly.NH2
Tunicata II	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>Leu</b>	<b>Cys</b>	<b>His</b>	<b>Ala</b>	Pro	Gly.NH2
Tunicata III	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	Tyr	<b>Glu</b>	<b>Phe</b>	<b>Met</b>	Pro	Gly.NH2
Tunicata IV	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>Asn</b>	<b>Gln</b>	Leu	<b>Thr</b>	Pro	Gly.NH2
Tunicata V	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	Tyr	<b>Glu</b>	<b>Tyr</b>	<b>Met</b>	Pro	Gly.NH2
Tunicata VI	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>Lys</b>	Gly	<b>Tyr</b>	<b>Ser</b>	Pro	Gly.NH2
Tunicata VII	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	Tyr	<b>Ala</b>	Leu	<b>Ser</b>	Pro	Gly.NH2
Tunicata VIII	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>Leu</b>	<b>Ala</b>	Leu	<b>Ser</b>	Pro	Gly.NH2
Tunicata IX	<b>pGLU</b>	His	Trp	Ser	<b>Asn</b>	<b>Lys</b>	Leu	<b>Ala</b>	Pro	Gly.NH2

**Estructura aminoacídica de GnRH tunicata X** (Adaptado de Tello, *et al* 2005) (23)

**Tunicata-X:** pGlu<sup>⊙⊙</sup>-His-Trp-Ser-Asn-Trp-Trp-Ile-Pro-Gly-Ala-Pro-Gly-Tyr-Asn-Gly-NH<sub>2</sub>.

⊙ Union GAP

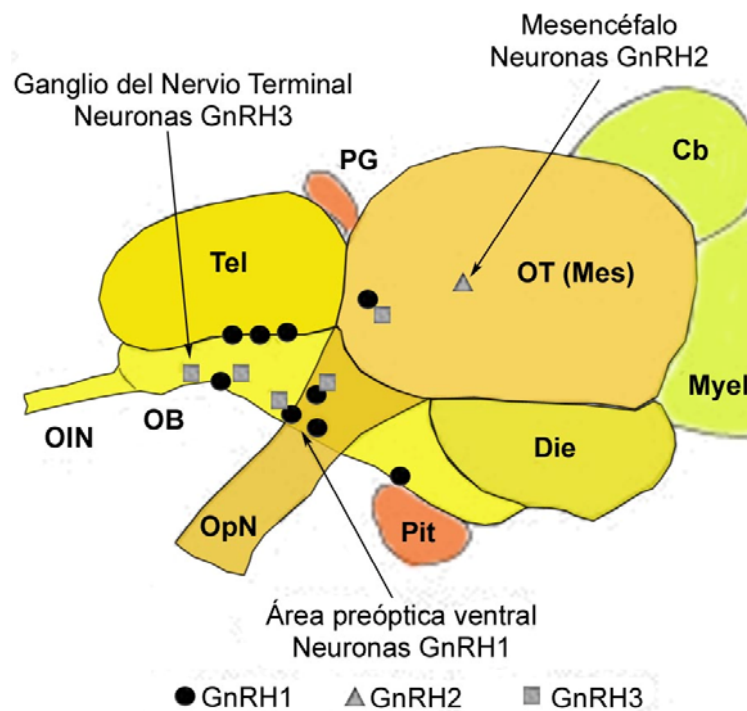
La GnRH tunicata X posee una secuencia de AA no convencional en la cual se encuentra dos uniones *gaps* entre los AA 1 y 2, lo cual facilita la unión y un total de 16 aminoácidos. No se encuentra descrito que tenga actividad biológica (23).

La nomenclatura usada para nombrar las variantes moleculares surge a partir del nombre de la especie donde fue aislada y la variación aminoacídica en una determinada posición a partir de

la estructura de mGnRH como estándar. Por ejemplo, cGnRH-II, aislada del pollo, es nombrada como [His5, Trp7, Tyr8] GnRH y gpGnRH, aislada del cobayo, es nombrada [Tyr2, Val7] GnRH. Sin embargo, la nomenclatura para denominar a las diferentes formas moleculares a partir de la especie donde fue aislada ha traído confusiones. Por lo tanto, Fernald, RD y White, R.B. (1999) (24) propusieron un nomenclador basado en la función, localización cerebral y algunos aspectos filogenéticos de la molécula de GnRH, sin tomar en consideración las secuencias de aminoácidos y nucleótidos. Las diferentes variantes naturales de GnRH fueron agrupadas en tres categorías: GnRH 1, GnRH 2 y GnRH 3. El grupo de análogos de GnRH1 tiene una localización hipotalámica y principalmente una función neuroendocrina sobre el control de la hipófisis, particularmente sobre la síntesis y liberación de FSH y LH, aunque también se le asigna funciones de neurotransmisor y neuromodulador (18, 25). El grupo GnRH2 tiene una localización en el cerebro medio con funciones no bien conocidas, aunque actuaría como neuromodulador y estaría implicado en diferentes aspectos de la conducta sexual y reproductiva (26). Finalmente, las isoformas que se localizan en el ganglio, en el nervio terminal y región telencefálica de peces teleósteos fueron denominadas GnRH 3 (25) (Figura 2 y Tabla 2). Sin embargo, esta nomenclatura no puede distinguir entre las diferentes formas encontradas en el hipotálamo de distintas especies. Por ejemplo, mGnRH, sbGnRH, cfGnRH, hrGnRH, wfGnRH, y pjGnRH pueden ser nombradas con la misma terminología: GnRH1. Además, en el caso de los salmónidos, sGnRH puede ser denominada tanto como GnRH3 como GnRH1 dependiendo de su localización neuroanatómica (27).



Es de notar que en las especies de vertebrados no mamíferos, la secuencia de AA de GnRH1 está muy diversificada, mientras que GnRH2 y GnRH3 se encuentra sin cambios secuenciales. Sin embargo, la estructura de GnRH1 en las especies mamíferas se encuentra completamente conservada. Probablemente, esto sea porque los mamíferos posean todavía un receptor de GnRH parálogo con la mayor afinidad por GnRH1 que ha limitado sustituciones de AA en el péptido de GnRH (28, 29).



**Figura 2.** Representación esquemática de la distribución de neuronas que expresan GnRH en el cerebro de peces teleósteos (medada) los cuales poseen las tres formas parálogas de GnRH. Las neuronas GnRH1 se ubican desde el área preóptica hasta la parte basal del hipotálamo vecino a la hipófisis anterior. Las neuronas GnRH3 aparecen principalmente en el ganglio del nervio terminal. Las neuronas GnRH2 se localizan exclusivamente en el mesencéfalo. Cb cerebelo; Die diencéfalo; Mes mesencéfalo; Myel mielencéfalo; OB bulbo olfatorio; OIN nervio olfatorio; OpN nervio óptico; OT tectum óptico; PG glándula pineal; Pit pituitaria; Tel telencéfalo. (Adaptado de Okubo, K. y Nagahama, Y. 2008).

**Tabla 2.** Clasificación de las variantes moleculares de GnRH de acuerdo a su localización (Adaptado de Whitlock, K.E. 2005) (25).

<b>GnRH I - FORMAS HIPOTALAMICAS</b>	<b>GnRH II - FORMAS MESENCEFALICAS</b>	<b>GnRH III - FORMAS TELENCEFALICAS</b>
GnRH1 humana	GnRH2 humana	goldfish GnRH3
Tree Shrew GnRH1	GnRH2 mono rhesus	zebrafish GnRH3
GnRH1 porcina	Tree Shrew GnRH2	GnRH3 A salmon
GnRH1 rata/ratón	musk Shrew GnRH2	GnRH3 B salmon
GnRH1 aviar	goldfish GnRH2	midshipman GnRH3
GnRH1 Xenopus	GnRH2 catfish	GnRH3 ciclidos
GnRH1 catfish	GnRH2 ciclidos	GnRH3 seabream
GnRH1 ciclidos	GnRH2 seabream	GnRH3 medaka
GnRH1 seabream	GnRH2 medaka	GnRH3 seabass
GnRH1 medaka	GnRH2 seabass	
GnRH1 seabass	GnRH2 anguila	
GnRH1 anguila		

Dubois y col (2002) (30) propusieron una nueva nomenclatura. En este caso, a la cGnRHII por su localización neuroanatómica en el mesencéfalo se la denominó MB-GnRH (del inglés midbrain GnRH), las formas de GnRH hipofisiotróficas específicas de especies fueron denominadas VF-GnRH (del inglés ventral forebrain GnRH) y por último con la sigla TN-GnRH (del inglés terminal nerve GnRH) se designa a sGnRH tanto en el ganglio y como en el nervio terminal. La presente terminología tendría problemas similares para nombrar a las variantes moleculares de GnRH que la propuesta por Fernald, RD y White, R.B. (1999) (24).

### **1.2.2. Número de variantes moleculares de GnRH en vertebrados**

La mayoría de las especies de vertebrados estudiadas expresan al menos dos variantes moleculares de GnRH (31-37). La primera demostración de la existencia de que al menos dos variantes moleculares de GnRH coexistían en el cerebro de una misma especie fue realizada por Miyamoto, K. y colaboradores (1984) en el pollo (15).

En la mayoría de los peces teleósteos se ha demostrado la presencia de dos variantes de GnRH y en más de 20 especies de estos tipos de peces se han detectado tres variantes moleculares de GnRH (16, 38-52). La mayoría de los anfibios estudiados expresan entre una y tres formas moleculares de GnRH (53-57). Sin embargo, en reptiles y aves han sido identificadas solamente dos variantes moleculares de GnRH (15, 46, 58-62).

En los mamíferos marsupiales e insectívoros (63-66) también se han identificado dos variantes moleculares de GnRH: GnRH1 (mGnRH) y GnRH2 (cIIGnRH). En los mamíferos euterios, el número de formas moleculares halladas varía entre una y tres. La GnRH1 es constante para todos los euterios, presentándose además GnRH2 (cIIGnRH) en el humano (70), los simios (67), el carpincho (69) y las musarañas (68) y los roedores múridos como la rata y el ratón (41, 54, 67). Estos últimos poseen cuerpos celulares GnRH2 localizados preferentemente en el cerebro mediodorsal y muy pocos en las regiones hipotalámicas (41). En estas dos especies aparecen escasas fibras GnRH2 en las inmediaciones de la eminencia media (54).

Morgan y Millar (2004) (68) identificaron en los bovinos los genes que codifican al decapeptido GnRH2 (cIIGnRH) y a su receptor (69). Estos mismos autores, basados en pruebas de activación de los receptores, sugieren que el decapeptido GnRH2 posee una modificación estructural, pues el AA triptofano en la posición tres es reemplazado por el AA arginina. Este hecho no modifica la afinidad por los receptores GnRH1 y GnRH2, pero inhibe la capacidad para activar el receptor GnRH2, con la consecuente posibilidad de que esta hormona actúe como modulador o antagonista de GnRH1. La presencia de receptores GnRH2 (cIIGnRH) no fue detectada en el tejido hipofisario de los bovinos. (68).

**Tabla 3:** Distribución taxonómica de las diferentes variantes de GnRH en mamíferos y método de caracterización.

ESPECIE		GnRH descripto				METODO	REFERENCIA
NOMBRE VULGAR	NOMBRE CIENTIFIICO						
<b>PROTOTERIOS</b>							
Echidna	<i>Tachyglossus aculeatus</i>				U	RP-HPLC/RIA	King, J. et al 1990
<b>METATERIOS</b>							
Comadreja	<i>Monodelphis doméstica</i>	C II	M			RP-HPLC/RIA	King, J. et al 1989
Comadreja	<i>Didelphis albiventris</i>	C II	M			RP-HPLC/RIA	Montaner, AD 2000
Possum	<i>Trichosurus vulpecula</i>	C II	M			RP-HPLC/RIA	King, JA et al 1994
Quoll	<i>Dasyurus viverrinus</i>	C II	M			RP-HPLC/RIA	Sherwood, N.M. et al 1997
Bandicoot	<i>Isodoom macrurus</i>	C II	M			RP-HPLC/RIA	Sherwood, N.M. et al 1997
Wallaby	<i>Macropus egenii</i>		M			RP-HPLC/RIA	Sherwood, N.M. et al 1997
<b>EUTERIOS</b>							
Musaraña	<i>Suncus murinus</i>	C II	M			AA	Dellovade, T. L. et al 1993
	<i>Tupaia glis</i>	C II	M			AA	Kasten, T. L. et al 1996
Topo	<i>Chysochloris asiatica</i>	C II	M			RP-HPLC/RIA	King, JA et al 1990
Murciélago	<i>Miniopterus scchereibersii</i>	C II	M			RP-HPLC/RIA	Sherwood, N. M. et al 1997
Peludo	<i>Chetophractus villosus</i>		M			IHQ	Montaner, AD 2000
Rata	<i>Rattus norvegicus</i>	CII	M		U 1	RP-HPLC/RIA	Fink, G 1988, White, R.B et al 1998; Yahalom, D et al 1999
Ratón	<i>Mus musculus</i>		M			DNA	Adelman, J.P. Et al 1986
Cobayo	<i>Cavia porcellus</i>			GP		DNA	Jimenez-Liñan, M. et al 1997
Hamster	<i>Mesocricetus auratus</i>		M	GP	U1	RP-HPLC/RIA	Lescheid, D.W et al 1997
Porcinos	<i>Sus scrofa</i>		M			AA	Matsuo, H. Et al 1971
Ovinos	<i>Ovis aries</i>		M			AA	Burgus, R. Et al 1972
Bovinos	<i>Bos taurus</i>		M		U 2	RP-HPLC/RIA	Yahalom, D et al 1999
Stumptail	<i>Macaca speciosa</i>	C II	M			DNA	Lescheid, D.W et al 1997
Mono rhesus	<i>Macacca mulatta</i>	C II	M			DNA	Lescheid, D.W et al 1997
Humanos	<i>Homo sapiens</i>	C II	M		U3	DNA/IHQ	Lescheid, D.W et al 1997, Yahalom, D et al 1999
Carpincho	<i>Hydrocherus Hydrochaeris</i>	C II	M	GP	U4	RP-HPLC/RIA	Montaner, AD. 2000
Cuis	<i>Cavia aparea</i>		M	GP		RP-HPLC/RIA	Montaner, AD 2000
Coipo	<i>Myocastor coypus</i>	C II	M		U3	RP-HPLC/RIA	Montaner, AD 2000
Vizcacha	<i>Lagostomus maximus</i>		M			RP-HPLC/RIA	Montaner, AD 2000

AA secuenciación de aminoácidos. DNA secuenciación del ADN complementario o genómico o por métodos indirectos como RP-HPLC/RIA o IHQ. U1-U2-U3-U4 tienen la misma posición de elución en RP-HPLC que sGnRH. M: mamífero; C II: Chicken 2; GP: guinea pig. U no identificado.

El grupo de roedores histricomorfos mostró características especiales ya que se constató, usando métodos cromatográficos e inmunológicos, la presencia de tres variantes de GnRH, estas formas, descritas en el carpincho (*Hydrochaeris hydrochaeris*), correspondieron a sGnRH, cIIGnRH y mGnRH (70, 71). Para el caso de los rumiantes se ha detectado la forma molecular GnRH1 (mGnRH). Sin embargo, en los bovinos se ha detectado una segunda forma molecular de GnRH con la misma posición de elución en cromatografía líquida de alta presión (RP-HPLC) que sGnRH (67) (Tabla N°3).

### **1.2.3. GnRH en tejidos extrahipotalámicos**

El péptido GnRH o sus variantes moleculares se expresan en diferentes tejidos corporales extrahipotalámicos sean estos cerebrales o no (9, 57). Si bien, el hipotálamo y la hipófisis son el principal complejo secretor-receptor de GnRH, la existencia de GnRH y receptores de GnRH en diferentes tejidos sugiere que podría originarse en tejidos diferentes al hipotalámico. Sin embargo, las funciones del GnRH extrahipotalámico no están todavía bien definidas (35, 36, 72).

En el cerebro de los mamíferos, la mayoría de los cuerpos celulares GnRH2 se localizan en el cerebro medio y muy pocos se han descrito en la región hipotalámica (41). Además las fibras proyectadas de GnRH2 que se dirigen hacia la eminencia media o las regiones que regulan la liberación de gonadotrofinas son muy escasas (54). Sin embargo, GnRH2 se expresa fuera del cerebro en órganos como la médula ósea, los riñones y la próstata (9, 63, 73). La expresión del gen GnRH-I se encuentra presente en una variedad de tejidos no neurales. En humanos, el mRNA de GnRH-I fue descrito en el corazón, el músculo esquelético, el riñón, la placenta, el ovario, la médula ósea, las células mononucleares sanguíneas, el testículo y la próstata (38, 74-80).

En la médula espinal de la oveja, la GnRH y el mRNA GnRHr fueron detectados por PCR e inmunohistoquímica. La inmunoreactividad a GnRH se detectó tanto en la sustancia gris como en la blanca en todos los segmentos de la médula espinal en concentraciones similares (73). En la sustancia gris se observó una mayor densidad de inmunomarcación en la lámina X, área correspondiente al canal central, pero no se inmunomarcaron cuerpos celulares. Se constató la presencia de concentraciones de material GnRH-ir en el asta ventral de la médula espinal en asociación con los cuerpos celulares de motoneuronas grandes. También se observó GnRH-ir en la superficie de las células endimarias. En la sustancia blanca, se inmunomarcaron fibras GnRH en proximidad de los vasos sanguíneos (73).

Existe información muy variada de la existencia de GnRH en otros tejidos fuera del SNC. Por ejemplo, por técnicas de inmunohistoquímica, se detectó la presencia de células GnRH-ir en la piel de la región frontonasal de fetos ovinos (81).

En el sistema reproductivo, en órganos tales como el ovario, la placenta, el oviducto y el testículo, existen evidencias de que se expresan formas funcionales del sistema GnRH y su receptor (GnRHr) en diferentes especies de animales como la rata, el conejo, el cerdo, la vaca, la oveja, los monos y el humano (35, 72, 80, 82, 83). La presencia de GnRHr en los roedores fue detectada en células de la granulosa y células luteales del ovario (80, 84-90) y en la células de Leydig del testículo (74, 91, 92). La expresión del mRNA de GnRH fue demostrado en tejidos y líneas celulares reproductivas de humanos (77, 78), gónadas de ratas (74, 93), y células endometriales humanas (94). Estudios de hibridación *in situ*, y PCR revelaron la localización de mRNA GnRH en células de la granulosa de los folículos ováricos primarios humanos (75, 79, 80) y en folículos y tejido luteal ovárico de vaca (95). La secuencia nucleotídica encontrada por análisis de PCR amplificada del tejido luteal y de las células de la granulosa revelaron una completa homología con la secuencia de cADN de los

receptores de GnRH de la hipófisis bovina. GnRH o moléculas similares a GnRH fueron detectadas en el líquido folicular de la vaca y la oveja (82, 83).

En el tejido testicular, tanto en fetos de ratas (96) como en ratas y humanos adultos, las células de los túbulos seminíferos fueron positivas para mRNA de GnRH, mientras que el mRNA para los receptores de GnRH se encontró en células intersticiales, incluidas las células de Leydig (74, 91, 97). También, en la rata y en el ratón, se detectaron receptores en células germinales (98). En espermatozoides y en células germinales posmeióticas humanas, se detectaron receptores de GnRH2 por métodos de hibridación *in situ*, se cree que estos receptores se encuentran relacionados con los procesos de espermatogénesis, maduración espermática y fertilización (99). Por análisis de la secuencia de nucleótidos se confirmó que los receptores de GnRH de los testículos de la rata y del hombre tienen idéntica secuencia que los encontrados en la hipófisis (95, 100, 101). GnRH o moléculas similares a GnRH, también fueron detectadas en el plasma seminal humano y en el fluido intersticial testicular (102), en células de la hilera germinal de la rata (98) por lo que se sugirió que las moléculas probablemente fuesen sintetizadas en las gónadas (93) y en la próstata (76).

#### **1.2.4. Agonistas sintéticos de la GnRH**

Las variantes moleculares sintéticas de GnRH son utilizadas tanto en medicina humana como veterinaria. Las mismas son utilizadas particularmente en la terapéutica de diversas alteraciones reproductivas, como parte de los tratamientos de fertilidad humana y animal, y en diferentes procedimientos biotecnológicos. Sin embargo, paradójicamente, la GnRH también es utilizada para inhibir los procesos reproductivos (103).

La secuencia de aminoácidos de los agonistas sintéticos de GnRH1 se encuentra conservada en las posiciones 1 a 5 y en las posiciones 7 y 8. Los productos sintéticos análogos a GnRH1

tienen un cambio constante en la posición 6, donde la glicina es cambiada por otra molécula diferente en cada agonista, y en algunos análogos también se encuentran cambios en la posición 9 y 10 (103, 104) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Secuencia aminoacídica de agonistas de GnRH1 utilizados en humanos y especies animales de interés productivo. Adaptado de Millar, R. et al 2004 (104)

Agonistas GnRH 1 (GNRH1)	AMINOACIDOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Lupron	pGLU	His	Trp	Ser	Tyr	<b>Dleu</b>	Leu	Arg		<b>ProNEt</b>
Zoladex	pGLU	His	Trp	Ser	Tyr	<b>Dser(tBo)</b>	Leu	Arg	Pro	Gly.NH2
Supprelin	pGLU	His	Trp	Ser	Tyr	<b>His(ImBzl)</b>	Leu	Arg	Pro	Gly.NH2
Synarel	pGLU	His	Trp	Ser	Tyr	<b>D Nal</b>	Leu	Arg	Pro	Gly.NH2
Triptorelina	pGLU	His	Trp	Ser	Tyr	<b>D Trp</b>	Leu	Arg	Pro	Gly.NH2
Buserelina	pGLU	His	Trp	Ser	Tyr	<b>Ser (tBu)</b>	Leu	Arg		<b>ProNEt</b>
Goserelina	pGLU	His	Trp	Ser	Tyr	<b>Ser (tBu)</b>	Leu	Arg	Pro	<b>AzGly</b>
Deslorelina	pGLU	His	Trp	Ser	Tyr	<b>D Trp</b>	Leu	Arg		<b>ProNEt</b>



### 1.3. Las Neuronas GnRH

#### 1.3.1. Morfología y morfometría de cuerpos celulares GnRH-ir

Las neuronas GnRH fueron caracterizadas en diferentes especies de mamíferos, a partir de cultivos celulares de la placoda olfativa y de tejidos encefálicos fetales y de animales adultos (81, 105-116).

La morfología y dimensiones de las neuronas GnRH pueden variar acorde a diferentes factores como la especie, (81, 106, 107, 111, 112, 114-120), la etapa de desarrollo ontogénico (105, 106, 114, 118, 121) y la ubicación en la región hipotalámica (105).

Durante la etapa embrionaria se han descrito tres tipos celulares a partir de cultivos celulares de placodas olfativas extraídas de embriones ovinos de 26 días de edad gestacional. En este estudio se pudieron inmunomarcarse neuronas GnRH a partir de los 10 a 17 días de comenzado el cultivo (106). Los tres tipos de células GnRH que se diferenciaron morfológicamente durante la etapa embrionaria en la especie ovina fueron:

1. *Células tipo neuroblástica*: con un tamaño promedio de  $5\pm 0,15$  y  $5,72\pm 0,2$   $\mu\text{m}$  respectivamente para cada uno de sus ejes. Por lo tanto, estas células tenían un aspecto redondeado y con prolongaciones extremadamente cortas, cuando existían.
2. *Neuronas migratorias*: se observaron como células de tipo fusiforme y bipolar con un eje somático mayor promedio de  $14,96\pm 0,84$   $\mu\text{m}$  y un eje menor de  $4,47\pm 0,26$   $\mu\text{m}$ . La longitud promedio de las prolongaciones neuronales fue de  $142,1\pm 9,49$   $\mu\text{m}$ .
3. *Neuronas en red*: representan un grupo celular que morfológicamente permite distinguir dos tipos celulares: uno bipolar y otro multipolar, ambos con somas de aspecto redondeado a triangular. Las neuronas multipolares fueron algo mayores que la bipolares, tanto para su eje mayor ( $12,5\pm 0,73$   $\mu\text{m}$  vs  $10,74\pm 0,5$   $\mu\text{m}$ ) como para su eje menor ( $6,78\pm 0,42$   $\mu\text{m}$  vs  $4,38\pm 0,14$   $\mu\text{m}$ ). Sin embargo, no hubo diferencias en la

longitud de los procesos neuronales (multipolares:  $43,49 \pm 2,89 \mu\text{m}$  vs bipolares:  $47,27 \pm 2,29 \mu\text{m}$ ). En algunos de los procesos neuronales se pudieron observar dilataciones cercanas al soma neuronal.

En cortes de tejidos encefálicos de fetos ovinos de 75 y 111 días de edad gestacional, por medio de técnicas de inmunohistoquímica, solamente se distinguieron dos tipos de neuronas GnRH-ir, una de tipo bipolar fusiforme y otro multipolar, ambas distribuidas en forma aislada o en pequeños grupos (118). En embriones de *Rhesus macaques* de 36 a 38 días de gestación se diferenciaron, por medio de inmunohistoquímica, neuronas GnRH-ir fusiformes uni o bipolares (113) y en fetos humanos las neuronas GnRH-ir se caracterizaron por ser fusiformes y bipolares y de un tamaño de  $28 \times 9 \mu\text{m}$  (111).

En diferentes especies de mamíferos adultos se han descrito tres tipos morfológicos de neuronas GnRH en la región hipotalámica a partir de cortes encefálicos y la aplicación de técnicas de inmunohistoquímica. Los tipos morfológicos de neuronas GnRH que se distinguieron fueron células unipolares, bipolares y multipolares (105, 111, 112, 114-117, 119-121). Sin embargo, diversos autores sugieren que las neuronas unipolares GnRH-ir serían inexistentes y que su hallazgo se debe a que solamente una de las prolongaciones es visible por efecto del plano de corte (112, 114, 115, 121).

En los rumiantes adultos, por técnicas de inmunohistoquímica en cortes de tejidos encefálicos de la región hipotalámica, fueron identificadas neuronas GnRH-ir de tipo bipolar y multipolar (105, 114, 121). El tipo celular predominante en los bovinos, ovinos y caprinos fue fusiforme y bipolar (105, 114, 121). El 58% de los somas de las neuronas GnRH-ir en la cabra fue de tipo bipolar, correspondiendo las restantes células inmunorreactivas a GnRH al tipo multipolar (121). Al igual que las neuronas GnRH en red durante la etapa fetal de los ovinos, descritas por Duittoz, A.H. et al (1997) (106), las neuronas GnRH de la región hipotalámica de los

bovinos y caprinos presentan, en uno de sus procesos, una dilatación cercana al cuerpo celular (114, 121). La presencia de uno u otro de los tipos morfológicos celulares, bipolar y multipolar, no parece tener relación con la localización anatómica ni en el bovino (114) ni en el caprino (121). Sin embargo, en las ovejas, las neuronas de tipo multipolar solamente se hallaron en el área preóptica y núcleo supraóptico (105). El diámetro de las neuronas GnRH-ir de la región hipotalámica de las ovejas, durante el diestro del ciclo estral, varió entre 12 a 20  $\mu\text{m}$ , siendo mayores a las descritas para la etapa embrionaria y fetal de los ovinos (105). En los caprinos adultos, los cuerpos celulares de GnRH-ir tuvieron un tamaño de 27 x 18  $\mu\text{m}$  (121). Los procesos celulares fueron frecuentemente tortuosos con longitudes aproximadas a los 100  $\mu\text{m}$  (114).

Los somas de las neuronas GnRH-ir en el equino (*Equus equus caballus*) y en los porcinos (*Sus scrofa*) fueron descritos como bipolares, unipolares o multipolares, siendo la mayoría de tipo bipolar (115, 119). El 66,7%  $\pm$  3,1% de las neuronas GnRH-ir del porcino fueron de tipo bipolar, el 23,1%  $\pm$  4,2% fue de tipo unipolar y el restante 10,2%  $\pm$  1,7% de tipo multipolar. Las neuronas GnRH-ir unipolares y bipolares se encontraron en todas las áreas hipotalámicas donde se hallaron estos tipos celulares, pero las neuronas multipolares fueron observadas principalmente en el área preóptica medial, en el hipotálamo medio basal y en el hipotálamo anterolateral. El diámetro de los somas celulares tenía un rango de 10 a 20  $\mu\text{m}$  y sus prolongaciones tenían una longitud superior a los 400  $\mu\text{m}$  (Kineman, R.D. et al 1988) (115, 119). Los procesos neuronales de muchas de las neuronas GnRH-ir unipolares del porcino tuvieron una forma de "T", con dos procesos extendiéndose desde el mismo polo cerca del soma (115).

En los murciélagos (*Myotis lucifugus lucifugus*), los somas de las neuronas GnRH-ir fueron caracterizados, mayoritariamente, como fusiformes y bipolares. Una pequeña cantidad fueron

neuronas de tipo unipolar y multipolar. Estas neuronas GnRH-ir tenían un núcleo no reactivo y una dilatación en uno o ambos procesos cercana al cuerpo celular, similar a la descrita en las neuronas bipolares de los rumiantes (112). Los cuerpos neuronales GnRH-ir tenían un tamaño medio de  $16,3 \pm 0,54 \mu\text{m}$  y  $7,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ , respectivamente para el eje mayor y menor, no encontrándose diferencias significativas entre sexos o época reproductiva ni entre adultos y fetos. Sin embargo, en las hembras gestantes se observó un mayor tamaño en el eje menor con respecto a las no gestantes ( $8,5 \pm 0,23 \mu\text{m}$  vs  $7,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ). Tampoco se observaron diferencias significativas entre las neuronas GnRH-ir de diferentes regiones hipotalámicas tales como el área preóptica, el área hipotalámica anterior y del núcleo arcuato (112).

En el lemur ratón adulto (*Microcebus murinus*, Cheirogaleidae, Primates), primate prosimio, se describieron dos tipos morfológicos de neuronas GnRH-ir en la región hipotalámica: células unipolares con un soma ovoideo y células bipolares con un soma fusiforme (116). Las neuronas GnRH-ir observadas en cortes encefálicos de coipo (*Myocastor coypus*) fueron exclusivamente bipolares, con unas dimensiones de  $21 \pm 8 \mu\text{m}$  de eje mayor,  $9,5 \pm 2,5 \mu\text{m}$  de eje menor y una superficie media de  $185 \pm 20 \mu\text{m}^2$  (120). De las especies estudiadas, estas dos fueron las únicas en que no se cita el hallazgo de neuronas GnRH-ir de tipo multipolar.

En los hurones adultos (*Mustela putorius*), las neuronas bipolares GnRH-ir midieron  $37 \times 13 \mu\text{m}$  y en la rata el tamaño promedio fue de  $16 \times 6 \mu\text{m}$  (111).

En el gato doméstico (*Felis catus*) las neuronas GnRH-ir se describen con un soma fusiforme de un rango de tamaño de 10 a  $25 \mu\text{m}$  con prolongaciones hasta de  $370 \mu\text{m}$ . Sin embargo, la mayoría de las neuronas GnRH-ir en esta especie tienen un tamaño mayor a  $20 \mu\text{m}$  con prolongaciones que no superan las  $100 \mu\text{m}$  (117).

### 1.3.2. Localización y número de las neuronas GnRH hipotalámicas

El número de neuronas y fibras GnRH en los mamíferos es escaso y existen variaciones en diferentes especies de animales (81, 107-109, 115, 116), las mutaciones genéticas (122), el período de desarrollo (106, 108-110), el sexo (118, 121, 123), la estación reproductiva en especies cuya reproducción es estacional (124) y diferentes acontecimientos reproductivos tales como la ciclicidad, el parto y el puerperio, entre otros (125) son posibles causas para explicar estas diferencias. También, la distribución de los somas neuronales y los axones GnRH difieren notoriamente en las áreas y núcleos de la región hipotalámica entre las diferentes especies animales.

En mamíferos adultos, se ha estimado un número aproximado de 550 a 1000 neuronas GnRH en el ratón (109, 122, 126), 580 a 1300 en la rata (108), 240 a 320 en los machos de ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus*) (127), 1000 a 1100 en el coipo (*Myocastor coypus*) (120), 1300 a 2500 en las ovejas (81), 2200 a 4000 en caprinos (107), 1100 en los porcinos (115) y 2400 en el mono Rhesus (108). En el lémur ratón adulto (*Microcebus murinus*), el número de neuronas GnRH-ir contabilizadas fue de 230 en el área preóptica medial (MPOA) y de 150 en la región hipotalámica basal (116).

En ratones mutantes GNR23, en los cuales la migración de las neuronas GnRH hacia el encéfalo es defectuosa durante la embriogénesis, se detectó una marcada disminución en el número total de neuronas GnRH encefálicas. Así, los ratones GNR23 heterocigotos tenían estimativamente 200 neuronas, mientras que la variedad GNR23 homocigotas poseía un número aproximado de 70 neuronas. Estos valores representan el 34% y 12% del número de neuronas GnRH cuantificadas en los ratones silvestres (122).

El número de células GnRH-ir contabilizadas en embriones de ratón no difirió significativamente con respecto a los adultos (109, 110). Sin embargo, Terasawa et al (1993)

(109, 110) hallaron un 50% menos de neuronas GnRH-ir durante la etapa fetal con respecto al adulto en el mono Rhesus. Por su lado, Duittoz et al (1997) (109, 110) contabilizaron un mayor número de células por placoda cultivada durante la etapa embrionaria y fetal de los ovinos. De manera que existen o no variaciones en el número de neuronas GnRH durante las diferentes etapas del desarrollo de un individuo entre las diferentes especies estudiadas.

En relación con el sexo, en la cabra se observó que los machos tenía un mayor número de células GnRH ( $4020 \pm 572$  células GnRH) que las hembras ( $2223 \pm 284$  células GnRH) (121). Sin embargo, no fueron observadas diferencias en el número de neuronas GnRH y en la distribución de los somas neuronales y fibras GnRH entre ambos sexos en la especie ovina durante los días 70 y 85 del desarrollo fetal (118, 123).

En los animales con estacionalidad reproductiva, como en el visón (*Mustela vison*), se evidenció una variación en el número de neuronas GnRH-ir según la etapa reproductiva, así es que las hembras poseen un número significativamente mayor de células GnRH-ir durante el verano (124). En los machos de ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus*) se observó un incremento significativo en el número de neuronas GnRH-ir durante la época reproductiva, pero este incremento solamente fue en la parte lateral del área preóptica (127). Sin embargo, en los machos de hamster sirio (*Mesocricetus auritus*) la acción del fotoperíodo no modificó el número total de neuronas GnRH-ir (128).

En la hembra bovina (*Bos taurus*), el porcentaje del área ocupado por las fibras GnRH-ir en la eminencia media fue significativamente menor en las vacas durante el período puerperal temprano con respecto a las hembras que se hallaban en el período puerperal tardío y al grupo de hembras cíclicas (125).

**Tabla 5.** Tamaño de las neuronas GnRH-ir durante la etapa embrionaria y fetal.

Especie	Tipo de neurona GnRH	Tamaño		Cita bibliográfica
		Eje mayor ( $\mu\text{m}$ )	Eje menor ( $\mu\text{m}$ )	
	Neuroblasto	5,72 $\pm$ 0,2	5 $\pm$ 0,15	
Ovinos ( <i>Ovis aries</i> )	Neurona migratoria	14,96 $\pm$ 0,84	4,47 $\pm$ 0,26	Duittoz et al 1997
	Multipolar	12,5 $\pm$ 0,73	6,78 $\pm$ 0,42	
	Neurona en red Bipolar	10,74 $\pm$ 0,5	4,38 $\pm$ 0,14	
Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	Neuronas bipolares	28	9	King and Anthony 1984

**Tabla 6.** Tamaño de las neuronas GnRH-ir en el adulto en diferentes especies de mamíferos.

Especie	Tipo de neurona GnRH	Tamaño		Cita bibliográfica
		Eje mayor ( $\mu\text{m}$ )	Eje menor ( $\mu\text{m}$ )	
Ovinos ( <i>Ovis aries</i> )	Neuronas bipolares	12 a 20	-	Advis et al 1985
Caprinos ( <i>Capra hircus</i> )	Neuronas bipolares	27	18	Zuccolilli et al 1994
Porcino ( <i>Sus scrofa</i> )	Neuronas bipolares	10 a 20	-	Kineman et al 1988
Murciélagos ( <i>Myotis lucifugus lucifugus</i> )	Neuronas bipolares	16,3 $\pm$ 0,54	7,7 $\pm$ 0,3	King et al 1984
Coipo ( <i>Myocastor coypus</i> )	Neuronas bipolares	21 $\pm$ 8	9,5 $\pm$ 2,5	Silva et al 2000
Hurón ( <i>Mustela putorius</i> )	Neuronas bipolares	37	13	King and Anthony 1984
Rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Neuronas bipolares	16	6	King and Anthony 1984
Gato ( <i>Felis catus</i> )	Neuronas bipolares	> 20	-	Belda et al 2000

- Dato no consignado

### 1.3.3. Distribución de las neuronas GnRH en el hipotálamo de especies no rumiantes

La ubicación hipotalámica de las neuronas GnRH es similar en la mayoría de los mamíferos adultos. Sin embargo, existen diferencias en la distribución de los somas neuronales en los distintos núcleos hipotalámicos. Las neuronas GnRH pueden aparecer en forma aislada o formando pequeños grupos en una distribución rostrocaudal que ocupa varios núcleos del hipotálamo, desde el área septo-preóptica hasta hipotálamo mediobasal. Distintos autores coinciden que existe una considerable variación en la proporción y localización de la mayor concentración de neuronas GnRH que se encuentran en las diferentes áreas del hipotálamo, así como también han señalado la presencia de algunas particularidades referidas a la especie animal utilizada (81, 105, 111, 112, 114-117, 119-121, 124, 129-131).

La población de neuronas GnRH en los roedores se ubica principalmente en el hipotálamo rostral (132-134). En la rata, se observó que la mayor concentración de neuronas GnRH-ir se encontraban en el área preóptica, en el área preóptica medial y en la banda diagonal de Broca. Las restantes neuronas se distribuyeron en el núcleo supraóptico, el núcleo acumbens y rara vez en el núcleo de la estría terminal (132). Sin embargo, en el coipo (*Myocastor coypus*) la mayor concentración de las neuronas GnRH-ir se encontró en el área preóptica y en el núcleo acumbens (120). En el hamster, al igual que en otros roedores, las principales áreas de concentración de las neuronas GnRH-ir fueron el área preóptica y el área septal, encontrándose también en el núcleo supraóptico, en el bulbo olfatorio y bulbo olfatorio accesorio. Ocasionalmente, se observan algunas neuronas GnRH-ir en el núcleo de la estría terminal y en el núcleo acumbens (133, 134).

En los porcinos, la mayor cantidad de somas GnRH-ir ( $44,5\% \pm 4,1\%$ ) fueron encontrados en el área medial preóptica con procesos axonales que finalizaban en el órgano vasculoso de la lámina terminal. El resto de los cuerpos neuronales GnRH-ir se distribuyeron en la banda



diagonal de Broca ( $6,7\% \pm 1,5\%$ ), núcleo supraquiasmático(19) ( $0,9\% \pm 0,4\%$ ), área hipotalámica anterior ( $14,8\% \pm 2,7\%$ ), hipotálamo medio basal ( $18,6\% \pm 5,3\%$ ), núcleo supraóptico ( $7,1\% \pm 1,3\%$ ), núcleo periventricular hipotalámico ( $7,0\% \pm 1,4\%$ ) y en la porción rostral del núcleo paraventricular hipotalámico ( $0,3\% \pm 0,3\%$ ) (115). Las fibras GnRH-ir se extienden en la especie porcina desde la porción ventromedial del área septal hasta el complejo mamilar. Tal como se ha mencionado para otras especies las fibras GnRH-ir finalizan en el órgano vasculoso de la lámina terminal y en la porción lateral de la eminencia media en aposición con los vasos portales primarios. Los somas ubicados en el área preóptica medial envían sus axones que se agrupan en dos grandes tractos de fibras GnRH-ir, de los cuales, uno se proyecta caudalmente a lo largo de la superficie ventral del diencefalo inmediatamente medial al núcleo supraóptico y finaliza en la eminencia media. El segundo tracto de fibras GnRH-ir también se dirige caudalmente próximo a la pared del tercer ventrículo y alcanza el complejo mamilar. Las fibras GnRH-ir que se identificaron en sectores extrahipotalámicos fueron localizados adyacentes a la porción ventral de los ventrículos laterales, en la estría terminal, en el núcleo habenular y en el tubérculo olfatorio (115).

En carnívoros como el hurón (*Mustela putorius furo*), la mayoría de las células GnRH-ir del hipotálamo se localizó en los núcleos medio basales ubicados por detrás del quiasma de los nervios ópticos, en especial, en el núcleo arcuato. Estos cuerpos celulares estaban asociados con un denso plexo de fibras GnRH-ir que se extiende hasta los capilares de la eminencia media. Ocasionalmente, se observaron cuerpos GnRH-ir aislados en alguno de los núcleos dorsales del hipotálamo (131). En otro carnívoro como el visón (*Mustela vison*), los cuerpos celulares GnRH-ir se ubicaron en el tubérculo olfatorio, la banda diagonal de Broca, los núcleos laterales del septum, el área preóptica, el área hipotalámica anterior y en el hipotálamo mediobasal. Sin embargo, el 80% de estos somas neuronales se encontraba dentro

del núcleo arcuato y la región periarcuata. Las fibras GnRH-ir terminaban mayoritariamente en el órgano vasculoso de la lámina terminal y en la eminencia media. Sólo unas pocas fibras GnRH-ir se extendían hasta finalizar en íntimo contacto con las células endocelulares que recubren los ventrículos laterales y el tercer ventrículo (124).

En monos y humanos, las neuronas GnRH se localizan principalmente en el hipotálamo mediobasal. Sin embargo, en los primates prosimios como el lemur ratón (*Microcebus murinus*), la distribución de las neuronas GnRH-ir fue significativamente mayor en el área preóptica con respecto al hipotálamo mediobasal, similar a la observada en los roedores y los rumiantes (116). En otros prosimios (Tupaia y Galago), las células GnRH-ir se encontraron en el hipotálamo rostral, específicamente en el área preóptica medial, área hipotalámica anterior y en la proximidad de la lámina terminal. Las fibras GnRH-ir del tracto hipotálamo-hipofisiario son numerosas en el área retroquiasmática y en la eminencia postinfundibular. Las fibras del tracto preóptico-terminal, originadas desde los somas cercanos a la lámina terminal finalizan en el órgano vasculoso de la lámina terminal (129).

En el cerebro del mono rhesus (*Macaca mulatta*) se expresan dos formas moleculares de GnRH. El mRNA de GnRH-I se expresa en forma difusa en la región hipotalámica, especialmente en las zonas ventrales, mientras que los mRNAs de GnRH II se encuentran concentrados en los núcleos supraóptico y paraventricular hipotalámico. Del análisis de más de 2000 neuronas GnRH, en ninguna instancia se detectó coexpresión del mRNA para los péptidos GnRH I y GnRH II (135).

Los somas neuronales GnRH-ir de los murciélagos (*Myotis lucifugus lucifugus*) están distribuidos en la parte ventral del encéfalo desde los bulbos olfatorios hasta los núcleos mamilares, pero son particularmente abundantes en el hipotálamo mediobasal. En esta área se localizan dentro de los límites del núcleo arcuato, extendiéndose lateral y dorsalmente en la

zona periventricular. Las neuronas GnRH-ir se encuentran dispersas en el tracto olfatorio lateral y medial, banda diagonal de Broca, núcleo septal lateral y medial, área preóptica, área hipotalámica anterior, núcleo ventromedial del hipotálamo y área premamilar. Las neuronas GnRH-ir de estas regiones principalmente se encuentran cercanas al tercer ventrículo o próximas al piso del diencefalo junto a la piamadre.

La distribución de las neuronas GnRH es similar para los murciélagos de ambos sexos, como también en los diferentes estadios reproductivos y etapa del desarrollo (feto y adulto). Ocasionalmente, se evidenciaron neuronas GnRH-ir en el órgano vasculoso de la lámina terminal dorsalmente al área preóptica bordeando la región ventral del tálamo, en la circunvolución del cíngulo, en la habénula y en el núcleo amigdalino medial. Las fibras GnRH-ir cursan a través del hipotálamo para converger ventralmente en la eminencia media. Solamente un pequeño porcentaje de fibras se extiende más lateralmente hacia la zona externa de la eminencia media. La mayoría de las fibras GnRH-ir forman una densa red en la eminencia media, pero un importante porcentaje desciende ventralmente en el tallo de la hipófisis y penetra en el interior de la glándula. Aquí las fibras divergen y finalizan dentro de la parte nerviosa o en contacto con las células glandulares de la parte intermedia. Otro grupo de fibras GnRH-ir se observa dorsal a la comisura anterior penetrando a la estría medular. Estas fibras continúan dorsalmente para alcanzar la división medial del núcleo habenular lateral, aunque un pequeño número de fibras alcanza el núcleo habenular medial. Unas pocas fibras parecen salir del complejo habenular para entrar al habenular retroflexus y proyectarse al núcleo interpeduncular del cerebro medio. Otro grupo de fibras GnRH-ir acompañan a la estría terminal y se dirigen directamente al núcleo medial de la amígdala. En el murciélago también se observaron fibras GnRH-ir en el limbo vertical de la banda diagonal de Broca, los tractos olfatorios (medial y lateral) y el tracto que ingresa al órgano subfornical.

La organización del sistema GnRH en el murciélago difiere con lo estudiado en la rata y guarda similitudes con los primates incluido el hombre. La mayor similitud está dada por la concentración de somas celulares en el hipotálamo mediobasal (112).

**Tabla 7.** Áreas hipotalámicas de mayor concentración de neuronas GnRH en diferentes ordenes o especies de mamíferos. A partir de los datos consignados por: *Aujard, F. et al 2005; Silva, L. et al 2000; Barry, J. 1980; Toumi, F.N. et al 1992; Sissk, C.L. et al 1988; Kineman, R.D. et al 1988; King, J, et al 1984; Melrose, P.A. et al 1994.*

Especie	Área de mayor concentración de neuronas GnRH
	Hipotálamo medio basal
Mono rhesus ( <i>Macaca mulatta</i> )	GnRH I – Aisladas en el hipotálamo medio basal GnRH II – Concentradas en el núcleo supraóptico, paraventricular e hipotálamo medio basal
Lemur ( <i>Microcebus murinus</i> )	Área preóptica
Visón ( <i>Mustela vison</i> )	
Hurón ( <i>Mustela putorius furo</i> )	Hipotálamo medio basal – Área retroquiasmática
Murciélago	
<i>Myotis lucifugus lucifugus</i>	Hipotálamo medio basal
Cerdo ( <i>Sus scrofa</i> )	Área preóptica
Coipo ( <i>Myocastor coypus</i> )	
Rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Área preóptica
Ratón ( <i>Mus musculus</i> )	

#### 1.3.4. Distribución de las neuronas GnRH en el hipotálamo de rumiantes adultos

En los rumiantes, los cuerpos celulares GnRH-ir aparecen en forma aislada o formando pequeños grupos. Estos se encuentran formando una distribución rostrocaudal en la parte ventral del hipotálamo, desde las áreas septales hasta la parte anterior de la región infundibular (81, 105, 114, 121, 130, 136). Las neuronas GnRH-ir se encuentran dispersas en varios núcleos o áreas que incluye el área preóptica, el área septal medial y el área medial preóptica. Estos sectores del hipotálamo alojan aproximadamente el 80% del total de cuerpos celulares GnRH-ir encefálicos de los rumiantes (81, 105, 114, 121). Sin embargo, entre el 52% y 62% de las células GnRH-ir en los rumiantes se encuentra en el área preóptica y aproximadamente el 50% del total queda circunscripta en una estrecha parte del área preóptica cercana al órgano vasculoso de la lámina terminal (81, 114, 121, 130, 137). Desde este sector,

la población de células GnRH-ir se extiende tanto hacia craneal como caudal, formando dos proyecciones a lo largo de las cuales, decrece progresivamente el número de somas inmunoractivos. La extensión rostral alcanza el área septal medial y queda ubicada entre el núcleo acumbens y la banda diagonal de Broca; sólo representa entre el 6 y 14% de la población total (81, 114, 121, 130, 137). La proyección caudal se extiende hacia el hipotálamo mediobasal y alcanza el núcleo arcuato, el cual contiene entre el 1% al 6% de las neuronas GnRH-ir (81, 121, 130, 136). En el área hipotalámica anterior y algunos núcleos laterales del hipotálamo se halló entre el 16% (81) y el 25% (130) de las neuronas GnRH-ir. Sin embargo, existe una discordancia en la proporción de neuronas halladas en el hipotálamo mediobasal de los rumiantes donde se plantea desde la inexistencia de las mismas en el bovino (114), del 1-2% (130, 136) hasta el 15% en los ovinos (81). Los restantes somas de las neuronas GnRH-ir se encuentran en áreas extrahipotalámicas en forma muy aislada, en cantidades que generalmente no superan el 1-2% aunque pueden llegar hasta el 5% (81, 114, 121, 137).

Las fibras GnRH-ir se encontraron presentes en la banda diagonal de Broca, el área preóptica medial, el área septal medial, el núcleo septal triangular, el núcleo supraóptico, el órgano vasculoso de la lámina terminal, la estría terminal, el núcleo amigdalino medial, el núcleo arcuato, la región infundibular, la eminencia media, el complejo habenular y el complejo mamilar (81, 105, 114, 121, 130, 137).

Sin lugar a dudas hay concordancia de todos los autores que señalan que la mayor parte de las fibras GnRH-ir alcanzan primariamente la eminencia media y el órgano vasculoso de la lámina terminal. Las que se distribuyen en la eminencia media forman una densa red que rodea los capilares primarios del sistema porta (114, 121, 136, 137). La porción rostral del eminencia media es el sector con mayor densidad de fibras GnRH-ir, aunque un número considerable de fibras también aparece en la porción media y caudal (114, 121, 137, 138). La

cantidad de material inmunorreactivo presente en la porción rostral de la eminencia media varía según los diferentes estadios reproductivos (lactación, anestro, diestro y ovulación) en la oveja (138).

Al igual que como sucede en otras especies no rumiantes, en los ovinos se ha observado una gran cantidad de fibras GnRH-ir que recorre el tallo de la pituitaria y finaliza en la parte neural y en contacto con las células de la parte intermedia de la glándula hipófisis (121, 137).

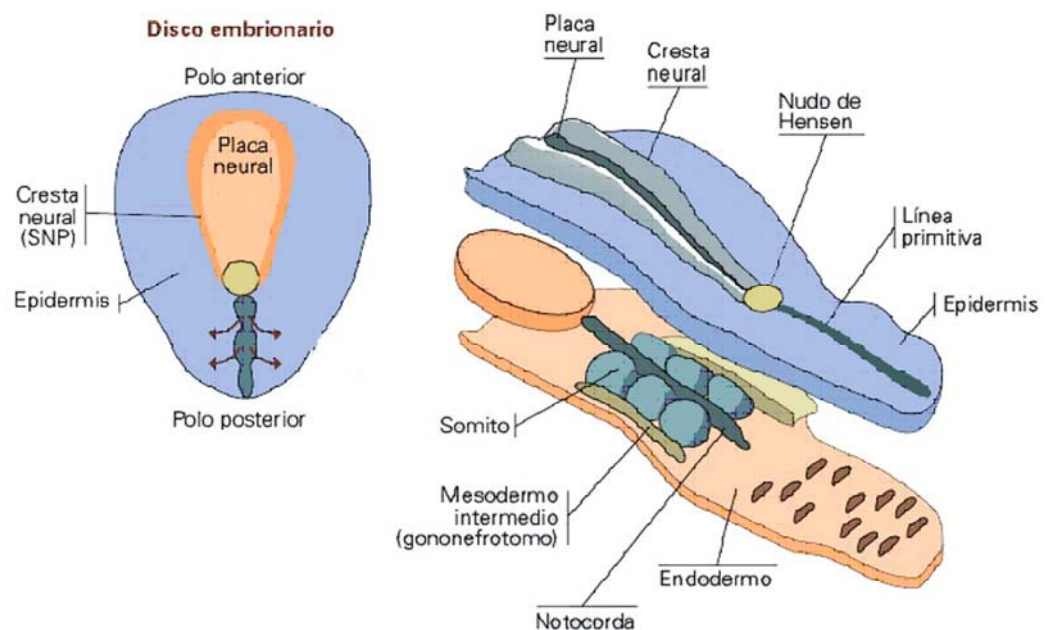
También en el órgano vasculoso de la lámina terminal de la cabra se observan abundantes fibras GnRH-ir y algunos somas neuronales. (121).

Las fibras GnRH-ir en el complejo premamilar están localizadas cercanas a la línea media dentro de la zona periventricular de la parte caudoventral del tercer ventrículo. Otro grupo de fibras fueron encontradas en conexión con el sistema habenular recorriendo la estría tálamo habenular (121, 137). En el área hipotalámica anterior de los bovinos, las fibras GnRH-ir constituyen dos vías que se extienden caudoventralmente hasta la eminencia media y el tallo infundibular. Una vía recorre la pared del tercer ventrículo hacia el infundíbulo atravesando sucesivamente los núcleos: periventricular y paraventricular hipotalámicos, y el núcleo arcuato. La otra vía ubicada en situación más lateral está formada por fibras que descienden hacia la eminencia media inmediatamente dorsal al núcleo supraóptico. Muchas fibras GnRH-ir finalizan en contacto con las células ependimales de la pared del tercer ventrículo (114).

## 1.4. Reseña del desarrollo del sistema nervioso y de las placodas olfativas

### 1.4.1. Introducción

Durante las fases finales de la gastrulación de los vertebrados, un grupo de células del ectodermo embrionario se desplaza y se transforma en el primordio del sistema nervioso. Simultáneamente, las restantes células ectodérmicas se separan de las anteriores para convertirse, durante el desarrollo ulterior, en la epidermis. De manera, que los fenómenos inductivos de la gastrulación, actúan para que una porción del ectodermo se transforme en el ectodermo neural, visible tempranamente como placa neural; mientras que el resto de las células se diferencia en ectodermo no neural. A la gastrulación le sigue el proceso de



**Figura 3.** Esquema del desarrollo del disco embrionario (16-18 días de gestación). En la vista dorsal (izquierda) se diferencian los sectores presuntivos del epiblasto (placa neural, cresta neural y epidermis prospectiva). La imagen de la derecha muestra, en un estadio más avanzado la formación de las crestas neurales y su relación con las estructuras mesodérmicas subyacentes. SNC sistema nervioso central y SNP periférico (Adaptado de ‘Ontogenia del Sistema Nervioso.’ Luis Puelles, Ed Viguera, 2006.)

neurulación y es por eso que comúnmente al embrión se denomina néurula durante este estadio. Este momento del desarrollo se caracteriza por la aparición de la placa neural (Figura



3), inmediatamente por delante del nodo de Hensen, la cual rápidamente evoluciona hacia un surco neural que finalmente se transforma en el tubo neural embrionario.

El tubo neural es el origen embrionario del encéfalo en su parte cefálica y a la médula espinal en las porciones medias y caudales del embrión, sitio donde establece íntima relación con el mesodermo somítico. Las células pluripotenciales derivadas del epiblasto del disco embrionario darán origen a los neuroblastos, células precursoras neurales (139).

### **1.1. Formación del tubo neural**

En los vertebrados, la placa neural se convierte en el tubo neural mediante dos mecanismos principales: neurulación primaria y secundaria. Sin embargo, en los mamíferos, la mayor parte del tubo neural se desarrolla por neurulación primaria y solamente los segmentos sacros de la médula espinal surgen por neurulación secundaria (140-142). La neurulación primaria describe un proceso por el cual las células de la placa neural bajo inducción de los tejidos vecinos (principalmente la inducción vertical del mesodermo subyacente), proliferan, se invaginan para formar un surco y finalmente se separan del ectodermo no neural para formar un tubo hueco. Por el contrario, en la neurulación secundaria la secuencia para la formación del tubo neural comienza a partir de células mesenquimáticas organizadas en un cordón sólido que posteriormente se cavita para formar un tubo.

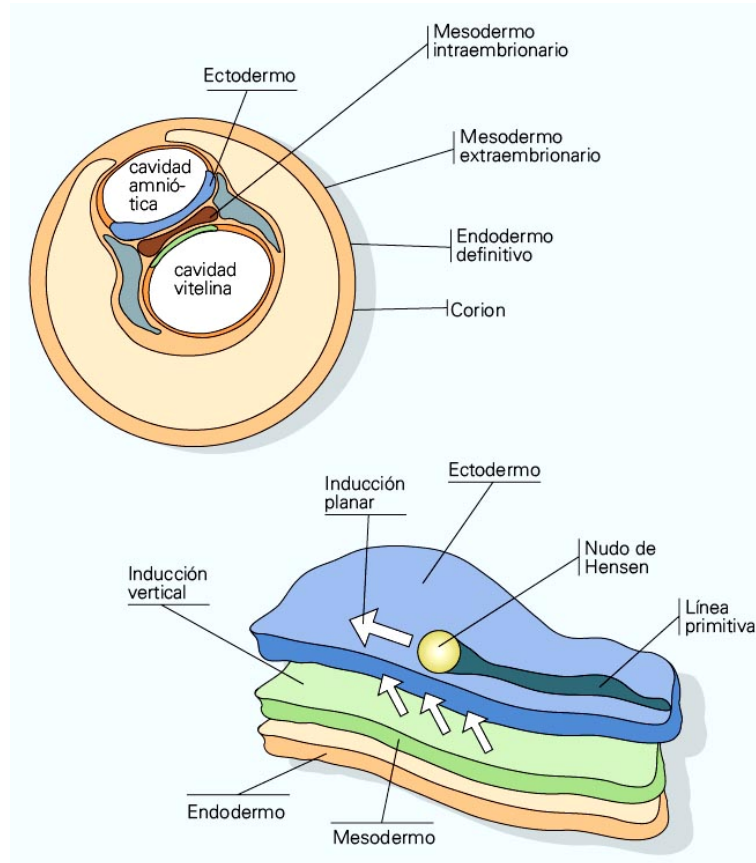
#### **1.4.2.1. Neurulación primaria**

Desde principios del siglo pasado se conoce que durante la neurulación, el principal responsable de los eventos es una inducción vertical sobre el ectodermo ejercida por el mesodermo axial. Este fenómeno descrito alrededor de 1920 por Spemann y Mangold es un efecto añadido a la inducción planar, demostrada recientemente y que determina el destino de

las células durante la primera parte de la gastrulación. Por lo tanto, puede afirmarse que la inducción vertical culmina y perfecciona los efectos que comenzaron con la inducción planar. La inducción vertical implica la difusión de moléculas inductivas desde la placa precordial y la notocorda hacia el ectodermo suprayacente, aportando señales para su regionalización céfalocaudal (partes precordial y epicordal del tubo neural) y dorsoventral (inducción de la placa del suelo y de la placa basal; efecto ‘ventralizante’ sobre todo el neuroectodermo) (Figuras 3 y 4). En términos generales quedan especificados varios destinos prospectivos en el ectodermo neural y no neural que dependen principalmente de la distancia de las células con relación a la línea media, sitio donde se encuentra la fuente del efecto inductor (Figura 3). A grandes rasgos podemos distinguir en el ectodermo las siguientes regiones: a) La porción central del ectodermo que se convierte en la placa neural, y ésta a su vez en el tubo neural (Figura 3) como esbozo del sistema nervioso central; b) A cada lado de la placa neural aparecen unas bandas que representan las prospectivas crestas neurales, fuente de neuronas y otros elementos del sistema nervioso periférico (Figuras 3 y 4); c) El ectodermo, que queda aún más lateral resulta especificado para formar la piel del embrión (Figuras 3 y 4); d) Además aparece una banda longitudinal discontinua, situada en paralelo a la cresta neural y a cierta distancia de ella conocida como banda placodal, donde se forman zonas ectodérmicas engrosadas con subsiguiente especialización histogenética, ya sea en dirección sensorial (placodas nasal, cristaliniiana y ótica), o como origen de algunas neuronas de los ganglios sensitivos craneales.

La neurulación primaria o formación del tubo neural comienza poco tiempo después de haberse formado la placa neural y dura aproximadamente 1 semana (humanos: 20-28 días de gestación). La primera manifestación visible del efecto de la inducción neural es la transformación de las células de la placa neural y las crestas neurales en células cilíndricas,

más altas que las células cuboideas del resto del ectodermo (Figuras 4 y 5). En consecuencia, la placa neural se eleva sobre el nivel del epiblasto, enmarcada por las crestas neurales. Las



**Figura 4.** Esquema del desarrollo del disco embrionario (16-18 días de gestación). En la sección de la vesícula embrionaria se observa la ubicación de las tres hojas embrionarias derivadas del epiblasto primitivo. En el esquema de la parte inferior se indican los sectores que intervienen en la inducción planar y vertical del ectodermo. (Adaptado de 'Ontogenia del Sistema Nervioso.' Luis Puelles, Ed Viguera,

células de la placa neural, de forma simultánea muestran cambios en la adhesividad y la morfología celulares. El cambio de la adhesividad celular es responsable del proceso de intercalación neuroepitelial: las células que se dividen cambian sus parejas de contacto dentro del epitelio, desplazándose a nuevas posiciones de equilibrio adhesivo. Este proceso favorece la adhesión longitudinal (con los vecinos de delante y detrás) sobre la transversal (con vecinos mediales o laterales). Este movimiento se evidencia por un alargamiento homogéneo progresivo de la placa neural.

El cambio de morfología celular individual debido principalmente a una reorganización del citoesqueleto a través de una secuencia de pasos dinámicos hacen progresivamente inestable la forma plana inicial de la placa neural y la llevan a replegarse sobre sí misma. Vemos así la elevación progresiva de las crestas neurales, formando el canal neural. Este luego llega a cerrarse mediante contacto, adhesión y fusión de sus dos bordes, que se encuentran secuencialmente en la línea media dorsal. Durante este proceso se desprenden a ambos lados las células de la cresta neural y se cierra por fuera el prospectivo epitelio cutáneo, dejando internalizado al tubo neural cerrado.

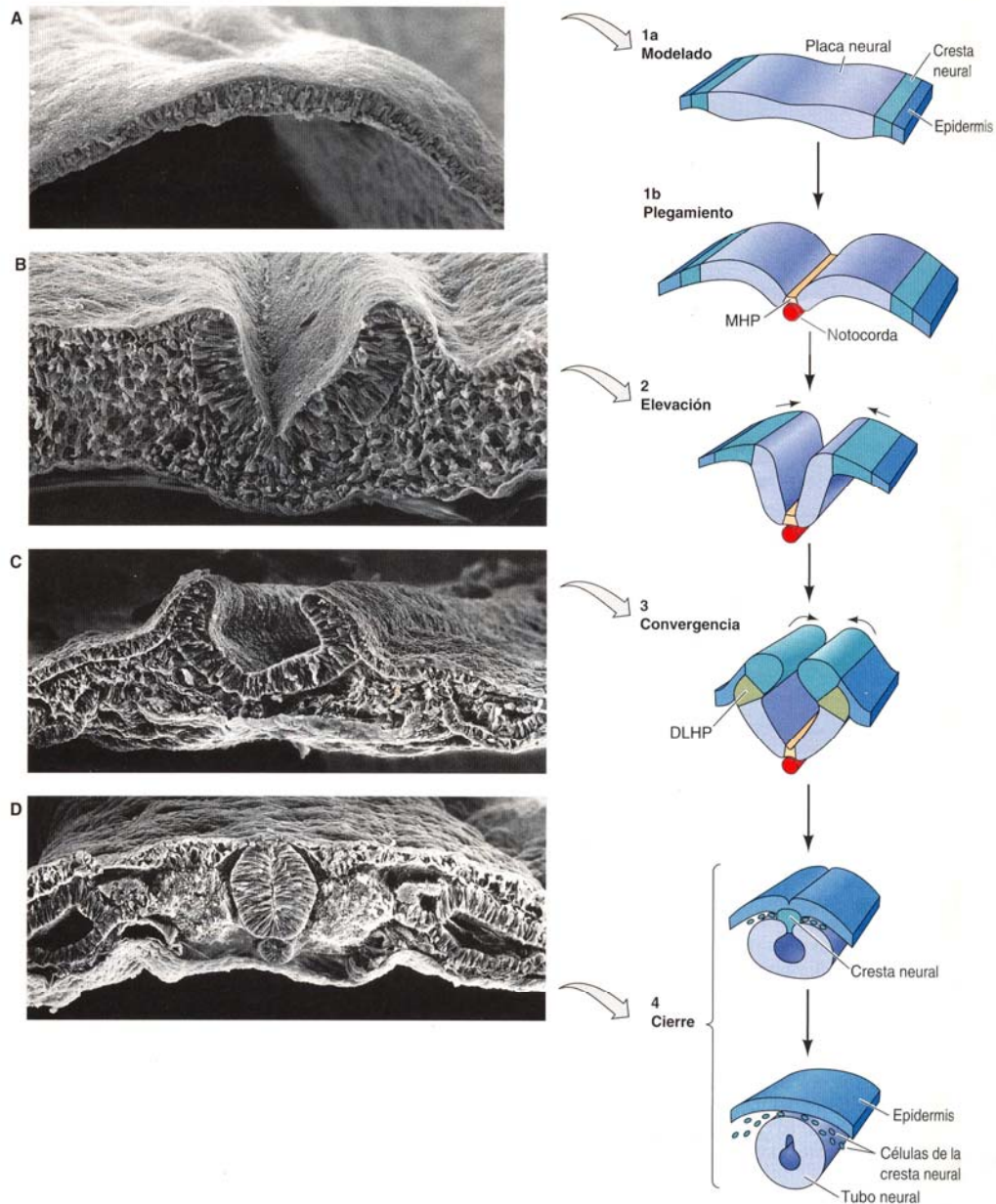
El proceso de cierre del surco neural comienza en uno o varios puntos intermedios y avanza luego hacia rostral y hacia caudal. En la extremidad cefálica se observa transitoriamente el neuroporo anterior, el cual se cierra hacia el día 25 de gestación (en humanos), mientras que en la parte caudal aparece un neuroporo posterior con cierre más tardío (Figura 5) (143-145).

Prácticamente el 50% del ectodermo está comprometido en la formación de la placa neural que está modelada por los movimientos intrínsecos de las regiones epidérmicas y de la misma placa neural (Figura 5 A, 1a y 1b). La placa neural se flexiona lo que implica la formación de regiones bisagras donde la placa neural contacta con los tejidos de alrededor. En los mamíferos, las células en la línea media de la placa neural reciben la denominación de células del MHP. Las células MHP se sujetan a la notocorda y forman una bisagra que favorece a la formación del surco neural (146, 147). Seguidamente, durante el período de plegamiento de la placa neural, surgen otras dos regiones bisagras denominadas puntos bisagras dorsolaterales (DLHP) situados a ambos lados laterales de la placa neural en conexión con el ectodermo no neural y la cresta neural (146, 147). Cada bisagra actúa como un eje que dirige la rotación de las células alrededor de estas, a lo cual se le suma la capacidad de la epidermis presuntiva de presionar hacia el centro y favorecer la formación del surco neural (Figura 5 B, C, 2 y 3)

(148). El tubo neural se forma a partir de la fusión de los pliegues neurales en la línea media dorsal del embrión. En los mamíferos, las células de la cresta neural craneal migran tempranamente antes del cierre del tubo neural, mientras que en la regiones que forman la médula espinal, las células de la cresta neural migran una vez que se produjo el cierre (Figura 5 D y 4).

#### **1.4.2.2. Neurulación secundaria**

La neurulación secundaria, como se ha mencionado, implica la condensación de células mesenquimáticas para formar un cordón medular sólido ubicado inmediatamente por debajo del ectodermo no neural superficial. En un momento posterior el cordón sufre el posterior ahuecamiento para conformar el tubo neural (149). En los mamíferos este mecanismo sólo se constata en los últimos segmentos de la médula espinal (sacros y caudales). Finalmente ambos tubos neurales formados por distintos mecanismos se fusionan en una sólo estructura.



**Figura 5.** Microfotografías de microscopía electrónica de barrido (izquierda) y representación esquemática del proceso de neurulación primaria (derecha). **A.1a.** Las células de la placa neural pueden distinguirse como células alargadas en la región dorsal del ectodermo. **A.1b.** El plegamiento comienza a medida que las células del punto de bisagra neural medio (MHP) se anclan a la notocorda, mientras las células del ectodermo no neural se mueven hacia la línea media. **B.2.** Los pliegues neurales son elevados por la presión que ejerce la epidermis presuntiva que continua moviéndose hacia la línea media. **C.3.** Se produce el acercamiento de los pliegues neurales por la aparición de las células del punto bisagra dorsolateral (DLHP) y las fuerzas mencionadas previamente. **D.4.** Los pliegues neurales toman contacto uno con otro, las células de la cresta neural se separan definitivamente y la epidermis presuntiva se une por arriba del tubo neural. Queda formado un tubo independiente de las estructuras vecinas, con paredes celulares y una luz interna. (Adaptado de Gilbert, S.F. 2005).

### 1.4.2.3. Diferenciación del tubo neural

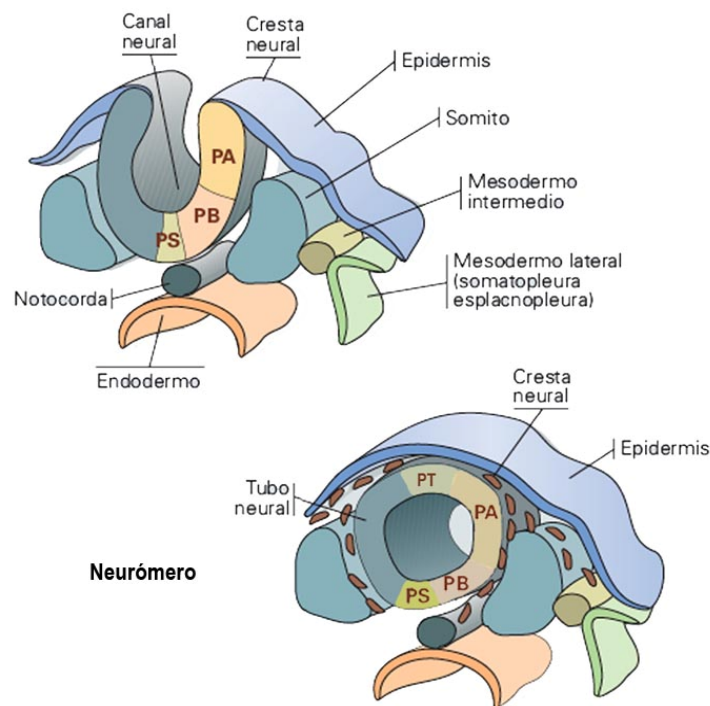
La transformación del tubo neural en las diferentes regiones del sistema nervioso central se produce simultáneamente. Este proceso de diferenciación involucra cambios en todos los niveles de organización, por lo tanto, se puede considerar constituido por modificaciones anatómicas, tisulares y celulares.

- a) *La diferenciación anatómica* es el proceso por el cual el tubo neural sufre dilataciones y constricciones que posibilitan la formación de las vesículas encefálicas y de la médula espinal.
- b) *La diferenciación tisular* está representada por los movimientos y migraciones de las poblaciones celulares que forman las paredes del tubo neural, las cuales se organizan y reorganizan para formar los distintos sectores anatomofuncionales del encéfalo y de la médula espinal.
- c) *La diferenciación celular* explica las distintas fases que atraviesan las células neuroepiteliales para diferenciarse en las diferentes estirpes de células nerviosas: neuronas y células de la glía.

### 1.4.2.4. Determinación de los ejes (Eje céfalocaudal y dorsoventral)

La inducción temprana de los diferentes territorios cefalocaudales del tubo neural lleva a una especificación regional que ya comienza a ponerse de manifiesto en el estadio de placa neural. La señalización mediada por distintas sustancias inductoras determina la aparición de sectores transversales (rodajas del tubo) de desarrollo independiente. Las principales regiones muestran, inmediatamente después de cerrarse el tubo neural, un crecimiento diferente e independiente que las lleva a formar grandes o pequeñas vesículas denominadas protosegmentos y segmentos neurales (neurómeros). Si el segmento transversal considerado es

una rodaja completa del tubo neural pues consta de un patrón dorsoventral “completo” (placa del techo, alar, basal y del piso) se considera como segmento neural o neurómero (Figura 6). Sin embargo, existen también fenómenos de especificación localizados que inducen un crecimiento diferencial y producen “vesículas” pares no segmentarias e incompletas. Estos fenómenos normalmente están restringidos a los sectores de la placa alar ubicados en dorsal a la placa precordial y corresponden a la formación de las vesículas ópticas, las vesículas telencefálicas y las placas cerebelosas.



**Figura 6** Segmento neural completo (neurómero). PS: placa del suelo, PB: placa basal, PT placa del techo y PA: placa alar. (Adaptado de ‘Ontogenia del Sistema Nervioso.’ Luis Puelles, Ed Viguera, 2006.)

El surco neural y el tubo neural temprano, en proceso de cierre, son estructuras casi rectas, que comienza a curvarse siguiendo el eje de desarrollo del embrión. Sin embargo, antes que finalice la formación de la porción caudal del tubo, la porción cefálica ya está experimentando cambios drásticos y es evidente su mayor desarrollo. Previo al cierre completo del neuroporo anterior aparecen las vesículas ópticas, que se forman por evaginación de sendos territorios

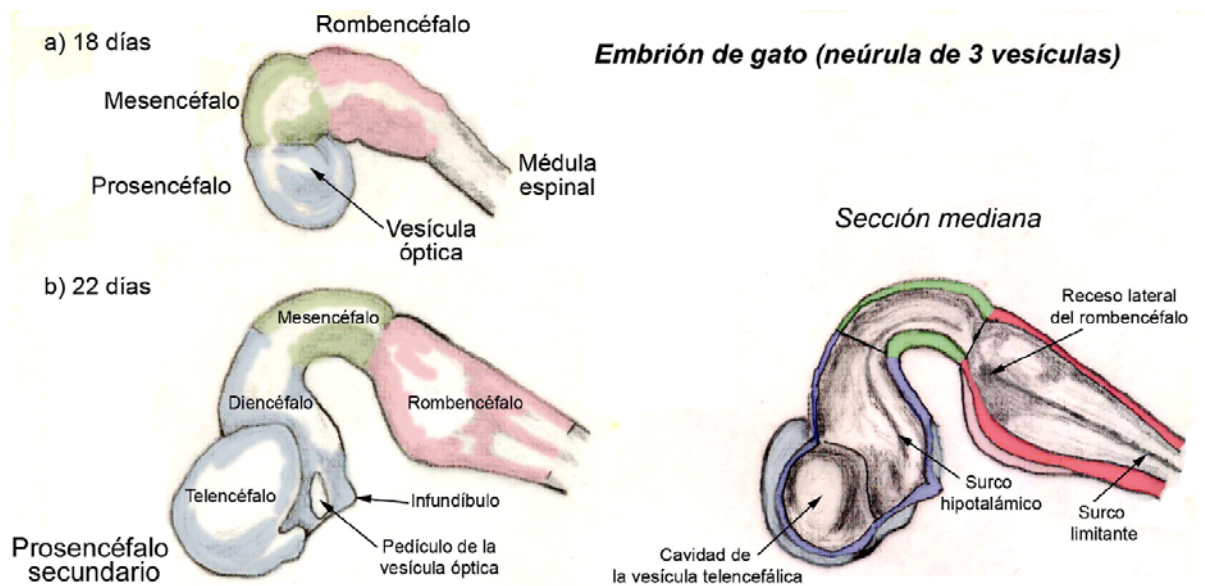


circulares a cada lado del extremo cefálico del tubo neural. La parte distal de las vesículas ópticas forma la copa óptica, diferenciada más tarde en retina neural y pigmentaria, mientras que su pedículo se convierte en el nervio óptico.

Poco tiempo después de la aparición de las vesículas ópticas, el desigual crecimiento de la parte cefálica del tubo neural se evidencia por la aparición de tres dilataciones o vesículas separadas por suaves estrechamientos (estadio de tres vesículas). Por lo tanto, en este estadio de tres vesículas el tubo neural (Figura 7) se describe formado por:

- (a) *Prosencéfalo o vesícula anterior* que comprende toda la porción anterior dilatada del tubo e incluye a las vesículas ópticas como divertículos laterales.
- (b) *Mesencéfalo o vesícula media* que permanece sin divisiones a lo largo del desarrollo del SNC.
- (c) *Rombencéfalo o vesícula posterior* que rápidamente se subdivide en numerosos rombómeros y pseudorombómeros.
- (d) *Médula espinal* representada por un cilindro nervioso de diámetro uniforme hasta el extremo caudal del embrión.

El prosencéfalo primario se subdivide rápidamente en dos protosegmentos: el prosencéfalo secundario ubicado rostrolateralmente que incluye las vesículas ópticas, y la vesícula diencefálica ubicada en posición más caudal (Figura 8). De la parte dorsal del prosencéfalo secundario se forman las vesículas telencefálicas, las cuales evolucionan para transformarse en los hemisferios cerebrales del animal adulto. La porción basal del prosencéfalo secundario forma las distintas partes del hipotálamo incluida la neurohipófisis. En el protosegmento diencefálico se observan tres segmentos (prosómeros 1, 2 y 3); que crecen para formar en su porción dorsal el pretectum, el tálamo-epitálamo y el pretálamo, mientras que de las porciones ventrales de los prosómeros se desarrolla el tegmento prerrubral.



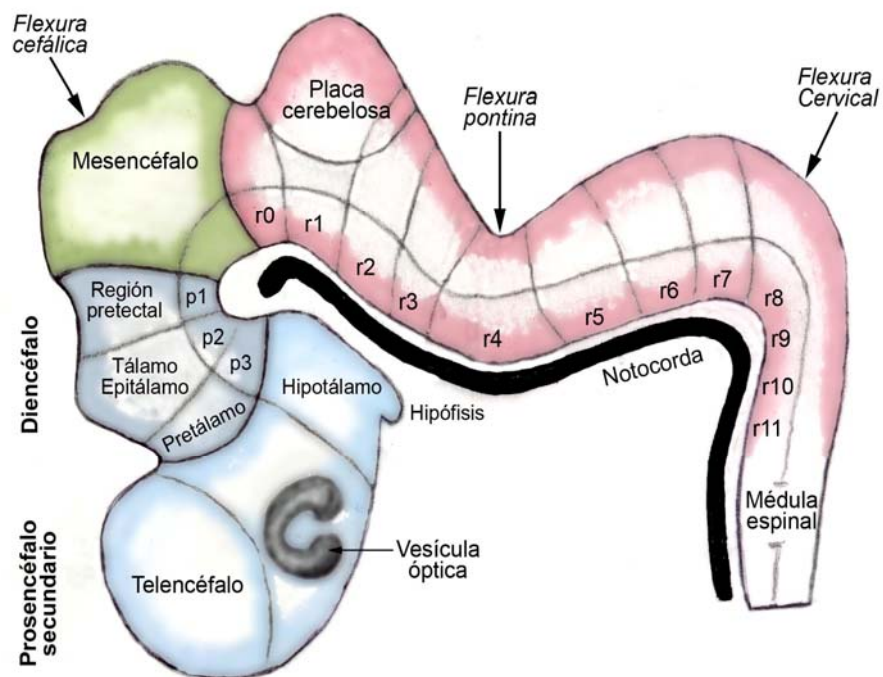
**Figura 7.** Representación semiesquemática del tubo neural de un embrión de gato de (a) 18 días y (b) 22 días. (Adaptado de 'Desarrollo del Sistema Nervioso.' Zuccolilli, G. 2010.)

El mesencéfalo aparece como una vesícula única que no se divide. Sin embargo, existe una subdivisión del techo donde crece el esbozo de un par de colículos rostrales y un par de colículos caudales, no habiendo aún evidencia sólida de que esto corresponda a una subdivisión segmentaria del mesencéfalo.

El rombencéfalo es la vesícula más caudal y muestra una considerable subdivisión neuromérica (rombómeros). Junto al mesencéfalo aparece el segmento ístmico como una porción estrecha (rombómero 0 o r0), y a continuación una serie de 7 rombómeros (r1-r7) bien diferenciados por surcos y seguidos de 4 pseudorombómeros (r8-r11) adicionales. Los rombómeros (r0-r7) son claramente visibles en todos los mamíferos y en las aves debido a que

existen ligeros estrechamientos entre ellos. Sin embargo, los pseudorrombómeros (r8-r11) aparecen como estructuras continuas sin demarcación sobre la superficie del embrión, similar a los neurómeros (mielómeros) de la médula espinal que no son aparentes externamente pero que determinan la organización segmentaria del SNC (Figura 8).

Todas estas unidades neuroméricas (prosómeros, rombómeros, pseudorrombómeros y mielómeros) se caracterizan por poseer una evolución particular e independiente de sus vecinas. En cada neurómero se desarrolla una población neuronal propia, pues la migración celular está restringida entre segmentos vecinos. Las poblaciones celulares aparecen de forma más o menos repetitiva en los distintos neurómeros y evidencian una organización metamérica del SNC. El origen de los nervios (craneales y espinales) se encuentra íntimamente asociado a la organización neuromérica del sistema, de hecho, las células de la



**Figura 8.** Representación esquemática de la subdivisión de las vesículas cefálicas. p1-p3: prosómeros 1 a 3; r0-r7: rombómeros 0 a 7; r8-r11: pseudorombómeros 8 a 11. (Adaptado de ‘Desarrollo del Sistema Nervioso.’ Zuccolilli, G. 2010.)

cresta neural adyacente a cada rombómero y mielómero forman los ganglios nerviosos que se describen en conexión con los nervios específicos. Durante el desarrollo, la división neuromérica permite que las células puedan desplazarse dentro de cada segmento pero están parcial o totalmente inhibidas para desplazarse entre neurómeros vecinos.

### **1.4.3 Las crestas neurales**

Las crestas neurales también derivan del ectodermo embrionario y sus células realizan extensas migraciones para dar origen a diferentes tipos celulares que incluyen a las neuronas y células de la glía de los ganglios nerviosos sensitivos, simpáticos, parasimpáticos y del sistema nervioso entérico. Además, las células de la médula de la glándula adrenal, los melanocitos de la piel y diferentes componentes celulares de los tejidos conectivos y esqueléticos del esplacnocráneo son derivados de la cresta neural.

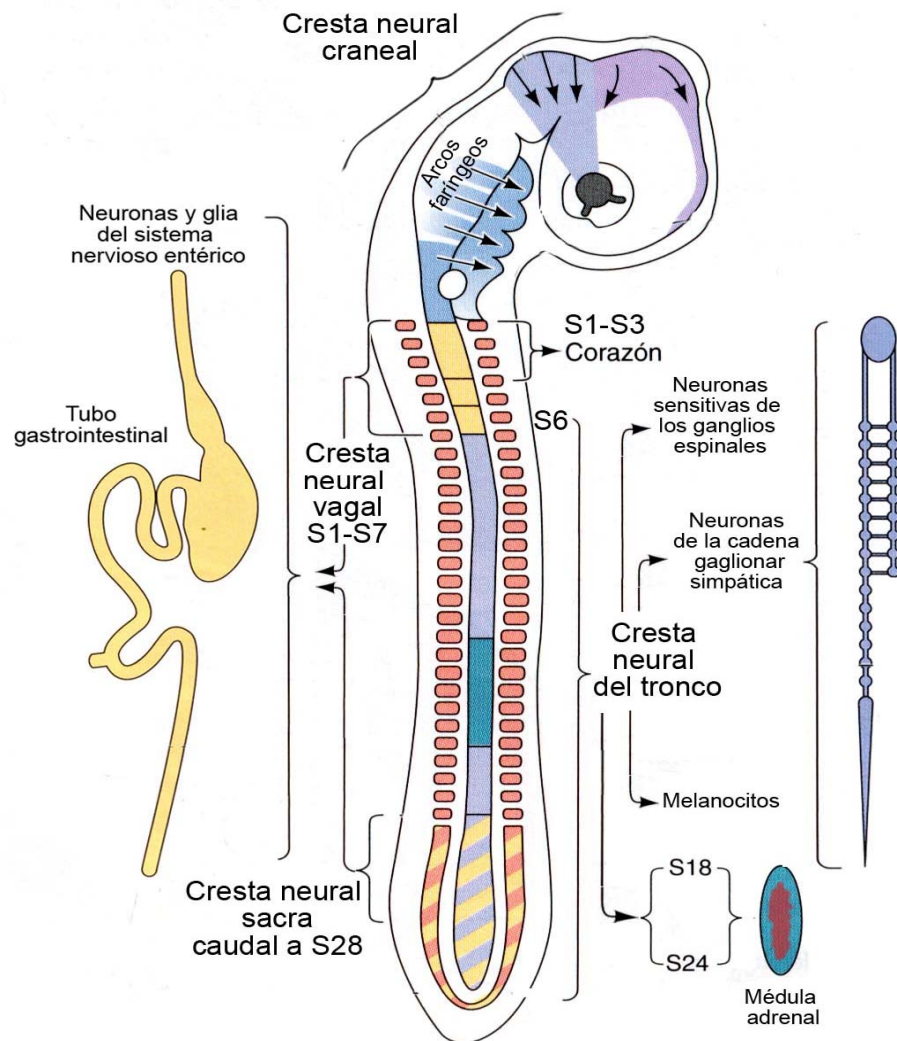
Las células de las crestas neurales se agrupan al principio como una banda discontinua a ambos lados del tubo neural, sin embargo, su migración comienza rápidamente y a partir de su posición inicial y destino final se las agrupa en cuatro dominios principales (Figura 9):

- a) Las células de la cresta neural craneal (cefálica) migran en sentido ventrolateal para producir el mesénquima craneofacial que se diferencia hacia cartílago, hueso, tejido conectivo de la cara, neuronas y glía de los ganglios de los nervios craneales. Estas células se ubican por delante de los somitos occipitales y migran a los arcos y bolsas faríngeas para dar origen a las células del timo, los odontoblastos del primordio del diente y los huesos del oído medio y de la mandíbula.
- b) Las células de la cresta neural del tronco se ubican desde el somita uno hasta la parte más caudal del embrión y migran a través de dos rutas principales. La ruta migratoria temprana la siguen las células que se desplazan ventrolateralmente a través de la mitad

anterior de cada esclerotoma. Estas células se mantienen dentro de los esclerotomas y forman los ganglios de la raíz dorsal de los nervios espinales, que contienen las neuronas sensitivas. Otras células continúan más ventralmente hasta alcanzar las aortas dorsales y forman los ganglios simpáticos, la medula adrenal y los grupos de neuronas que rodean la arteria aorta. La segunda ruta de migración es algo más tardía y es seguida por las células que se convierten en melanocitos cutáneos. Su migración es en sentido dorsolateral hacia el ectodermo y se mueven luego para colonizar toda la piel.

c) Las células de la cresta neural vagal y sacra se originan en la proximidad de los somitas uno a siete y en los segmentos sacros (caudales al somita 28) y realizan una migración hacia el intestino embrionario. En las paredes de los órganos derivados del mismo (tubo digestivo) forman los distintos componentes celulares (neuronas y glía) del SNE.

d) Las células de la cresta neural cardíaca: forman un pequeño grupo de células que se originan próximas a los tres primeros somitas. Estas células producen la totalidad del tejido conectivo-muscular de la pared de los grandes vasos arteriales a medida que se originan desde el corazón. También se ha demostrado que pueden diferenciarse a melanocitos y neuronas. Sin embargo, algunas de ellas colonizan los últimos arcos faríngeos (tercero, cuarto y sexto) y forman cartílago y tejido conectivo.



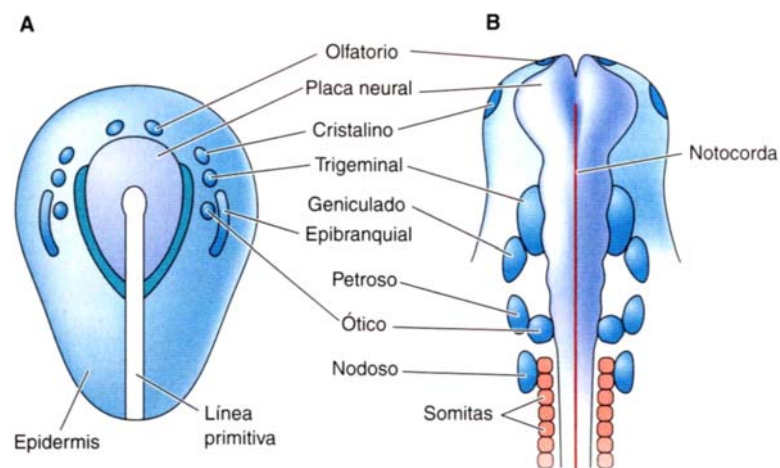
**Figura 9.** Esquema de las distintas regiones en que se subdivide la cresta neural. Las estirpes celulares en que se diferencian las células de la cresta neural son distintas según la región considerada (Adaptado de Gilbert, S.F. 2005).

### 1.1. Desarrollo de las placodas

Las células de la cresta neural craneal forman un grupo celular que son de reconocida importancia en la formación de la cabeza de los vertebrados durante la evolución. Los principales órganos sensoriales de la cabeza se desarrollan a partir de complejas interacciones entre la cresta neural cefálica con una serie de engrosamientos del ectodermo no neural denominados placodas ectodérmicas craneales. van Wijhe (1883), Froriep (1885) y von

Kupffer (1891, 1895) fueron los pioneros que describieron por primera vez las placodas como delgadas capas transitorias del ectodermo craneal (25, 150, 151).

Actualmente se describen diferentes placodas craneales (Figuras 10 y 11) denominadas adenohipofisiaria, olfatoria, lenticular, trigeminal, y las placodas profundas, epibranchial e hipobranchial, placoda ótica, y series lineales de placodas laterales (152-157). La mayoría de estas placodas se encuentran presentes en casi todos los vertebrados. Sin embargo, la placoda hipobranchial solamente se encuentra citada en los anfibios. (158-160) además, el número de placodas epibranchiales y de la línea de placodas laterales difiere para los diferentes grupos taxonómicos de amniotas (161-164).

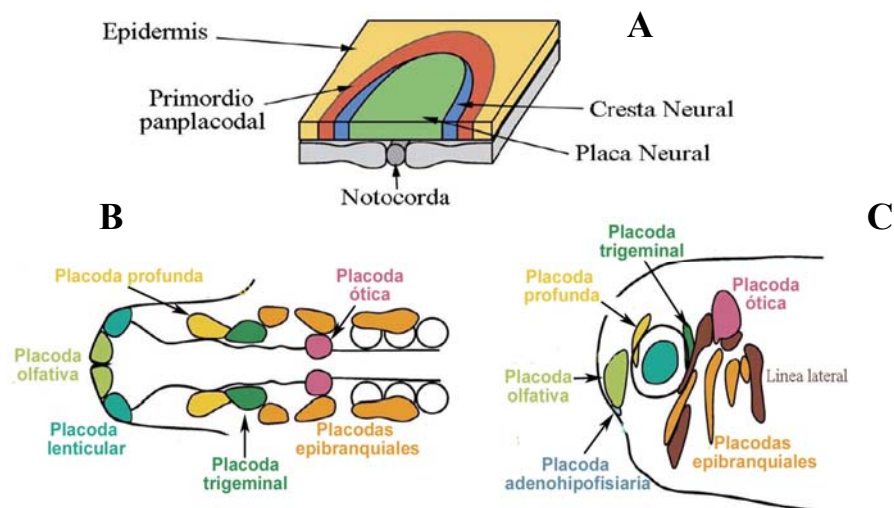


**Figura 10.** Esquema de la evolución temprana de las placodas. En (A) se esquematiza la posición de las células placodales laterales a la cresta neural. En (B) se muestra que al comienzo del periodo somítico las placodas han alcanzado su localización definitiva. (Adaptado de Gilbert, S.F. 2005).

Todas las placodas son áreas especializadas del ectodermo de la parte cefálica cuyas células se ubican en una banda discontinua ubicada lateral de la placa neural y la cresta neural. Estas células muestran progresivos cambios en su forma y comienzan un proceso de diferenciación hacia varios tipos de células no epidérmicas. Las placodas son regiones de una intensa proliferación celular cuando se comparan con las células epidérmicas (165, 166). El desarrollo

de los derivados de una placoda frecuentemente implica cambios de la forma celular e intensos movimientos morfogénéticos (152-154, 167), hecho que permite a las placodas desarrollarse y diferenciarse en un epitelio columnar que puede invaginarse y dar origen a diferentes tipos de células con capacidad migratoria (neuronas, células endocrinas, células precursoras de la glía o células primordiales de la línea lateral).

Las placodas hasta el momento estudiadas, con la excepción de la placoda adenohipofisiaria y la lenticular son neurogénicas (159, 168-171). Sin embargo, si bien las diferentes placodas



**Figura 11.** Representación esquemática de la cresta neural, el primordio panplacodal y la epidermis alrededor de la placa neural (A); de las placodas craneales en el estadio de 10 a 13 somitas en embrión de pollo (B); y de las placodas craneales (vista lateral) en embrión de Xenopus (C). La coloración del área de la placoda es coincidente con la coloración de la denominación (Adaptado de Schlosser, G. 2006).

craneales poseen las similitudes señaladas, ellas difieren no sólo, en el momento y secuencia del desarrollo sino también que dan origen a distintos órganos sensoriales y ganglios, cada uno derivado de un tipo grupo celular diferente.

#### 1.4.4.1. La placoda olfatoria

La placoda olfatoria ha despertado mucho interés entre los investigadores debido a que es la única placoda donde se han encontrado *stem cells* capaces de originar distintas estirpes celulares (172-175). Las células placodales se invaginan progresivamente para formar el



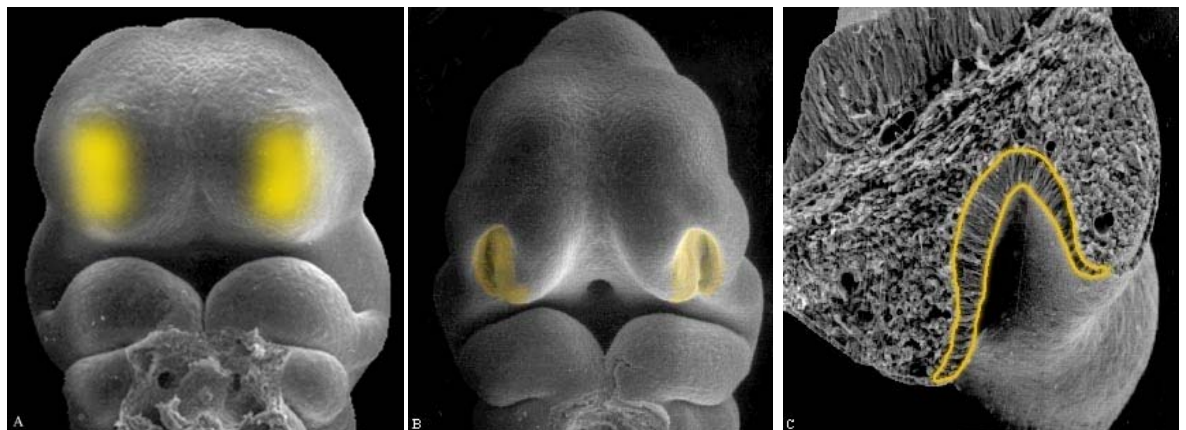
epitelio olfatorio y el órgano vomeronasal (176-184). Este epitelio contiene células secretorias, productoras de secreciones mucosas, células de soporte, y células sensoriales primarias. En especial, este último grupo de células tiene receptores olfatorios específicos para sustancias con acción feromonal y sus axones forman los nervios olfatorios y vomeronasal. Por otro lado, la placoda olfativa es la única placoda en la cual se ha demostrado que las células se diferencian hacia células gliales, incluyendo astrocitos y oligodendrocitos que forman la vaina de los axones del nervio olfatorio y migran a lo largo de este nervio para finalmente ubicarse en el bulbo olfatorio del cerebro (178, 185-187).

Las placodas olfativas no se originan en forma aislada. Mientras las células placodales convergen, las células de la cresta neural craneal migran hacia el extremo cefálico del embrión (25, 188, 189).

Durante el estadio de néurula de tres vesículas, las células de la cresta neural cefálica realizan la migración hacia craneal inmediatamente por dorsal de la vesícula óptica y de esta forma alcanzan la parte más rostral del primer arco branquial que da origen a los elementos estructurales de la nariz. Esta migración rostral de las células de la cresta neural craneal ocurre momentos antes de la formación de la placoda olfatoria. Por consiguiente, la diferenciación morfológica de la placoda olfativa probablemente también compromete a las células de la cresta neural craneal asociadas con la placoda (25).

Durante la diferenciación de los distintos componentes que forman el primer arco branquial, la placoda olfatoria se invagina en dos oportunidades (Figura 12). La primera invaginación, es muy notoria y acompaña el desarrollo de la cavidad nasal ya que la placoda profundiza en el interior de la misma hasta alcanzar el fondo. La segunda invaginación es menos pronunciada y corresponde a la formación de un receso medial que da origen al órgano vomeronasal.

El reconocimiento topográfico de la placoda olfativa en los ovinos, en secciones parafinadas y teñidas con cresil violeta, fue exitosamente realizado a partir de embriones de 22 días (118). En este estudio la placoda se ubicó, en un principio, como una delgada capa del ectodermo nasal localizado por debajo de la prominencia frontonasal. Aproximadamente en el día 26 y posteriormente a su invaginación, las células placodales se observaron claramente en cortes horizontales del embrión, en la formación de los dos procesos invaginantes que dan origen al sistema olfatorio principal y al accesorio (órgano vomeronasal) (118). A medida que se profundizan los procesos invaginantes se desarrollan los etmoturbinados del hueso etmoides, que se evidencian entre los días 29 y 35 del desarrollo embrionario (118). Se ha hipotetizado primero y confirmado en cierta medida, que la placoda olfatoria da origen a diversas poblaciones de neuronas secretorias de neuropéptidos reguladores, tales como el Neuropeptido Y, el FMRFamide (fenilalanina-metionina-arginina-fenilalanina-amida), y



**Figura 12.** Fotografía de un embrión de ratón de 10 días. A y B vista frontal, en donde se marca la placoda olfativa (amarillo) sobre la prominencia frontonasal y su posterior invaginación primaria. C: corte transversal de la prominencia frontonasal donde se demarca (amarillo) la placoda olfativa (Adaptado de Embryo images. Normal and abnormal mammalian development 2009)

GnRH. Estas neuronas secretorias migran a lo largo de los nervios olfatorios y vomeronasales hacia el cerebro (109, 190-199).

Otros estudios (200-202), identifican una subpoblación de células GnRH derivadas de la placoda olfativa y probablemente de la cresta neural que intervienen en la formación del nervio terminal, el cual es considerado un nervio craneal con efecto neuromodulador sobre varias poblaciones neuronales y células neuroendocrinas, incluyendo las propias células receptoras olfatorias (203-205).

En síntesis, la placoda olfatoria es un sector embriológico de mucho interés ya que proporciona neuronas secretorias que deben recorrer un importante trayecto migratorio para alcanzar su definitiva posición dentro del hipotálamo o en regiones vecinas. Además la mayoría de los trabajos consultados permiten reconocer un mecanismo conservado filogenéticamente en la mayoría de los vertebrados.

## **1.5. Origen y migración de las neuronas GnRH**

### **1.5.1 Introducción**

Distintos grupos de investigación, utilizando diferentes técnicas, tales como cultivos celulares (106, 108, 206, 207), inmunohistoquímica en embriones fijados (109, 208-213), hibridación *in situ* (214), ablación de la placoda olfativa (195, 215, 216) y diversas técnicas genéticas y moleculares (122, 196, 217, 218), han contribuido para conocer el origen de las neuronas GnRH. Los estudios indican que estas neuronas se originan por fuera del tubo neural, concretamente en la placoda olfativa de los mamíferos estudiados y posteriormente comienzan una migración a través de la cavidad nasal, por las paredes del septo nasal, para alcanzar su definitiva localización en el encéfalo. Esta migración celular se realiza utilizando los axones del nervio terminal y de los nervios vomeronasales como una guía para el pasaje de las neuronas a través de la placa cribada del hueso etmoides. De esta forma las neuronas GnRH-ir se trasladan hasta su localización final en la región del hipotálamo (197, 199, 207, 219).

### **1.5.2. Origen y migración de las neuronas GnRH en anfibios, peces y aves**

En los peces, la población de células GnRH es fácil de identificar en el nervio terminal y en varias regiones encefálicas. Frecuentemente se distinguen diferentes formas de GnRH3 y la presencia de células que expresan estas formas moleculares en el nervio terminal varía con la edad del individuo en estudio. De la misma forma, la presencia de elementos que expresan GnRH1 en el hipotálamo de los peces depende sustancialmente de la edad. La variante estructural GnRH2 es una forma originalmente aislada del cerebro de pollo (chGnRH2) y es la única forma molecular que se encuentra conservada desde los peces hasta los mamíferos (31). La GnRH2 se encuentra presente sólo en las regiones del mesencéfalo y aparentemente

su migración difiere considerablemente de las otras dos variantes moleculares. Durante el desarrollo embriológico del pez cebra, las células que expresan GnRH2 se evidencian en primer término yaciendo lateralmente al tubo neural en formación (220). Mediante el uso de oligonucleótidos (morfolinos) que bloquean el mRNA se impidió la expresión de determinados genes que actúan en el desarrollo de la cresta neural cefálica, hecho que evidenció la pérdida de las células GnRH3 del nervio terminal y también las células GnRH2 del mesencéfalo (25).

Algunos grupos de investigadores han propuesto que las neuronas GnRH1 y 3 deben considerarse como dos subpoblaciones (GnRH1 y GnRH3) con orígenes embrionarios distintos (30, 221). Consistente con esta hipótesis, en estudios realizados con el pez cebra (*Danio rerio*), las células GnRH3 observadas en el nervio terminal tienen un origen en la cresta neural craneal, mientras que las neuronas GnRH1 del hipotálamo se originan de la placoda de la pituitaria anterior (188, 217). La placoda de la pituitaria anterior del pez cebra se origina de una población de células localizadas sobre la línea media en la porción anterior de la placa neural. (222, 223). Las variedades mutantes *you-too* y *detour* de esta especie de pez se caracterizan por la ausencia de la glándula pituitaria (224) y en estos ejemplares se observó también la pérdida de las neuronas GnRH1 de la región hipotalámica. Sin embargo, no se constató variación de las neuronas GnRH3 sobre el nervio terminal (217). En ambas variedades de mutantes, los órganos olfatorios se desarrollan normalmente y la ausencia de las neuronas GnRH1 no parece ser el resultado de la pérdida de la placoda olfativa. Por lo tanto, es muy probable que exista un origen común de las neuronas GnRH1 y los precursores de la pituitaria anterior.

En los anfibios, la remoción de la placoda olfativa provoca la pérdida del epitelio olfatorio, nervio olfatorio y bulbo olfatorio y además es causal de la ausencia de células GnRH (195,

215). Los estudios realizados utilizando la ablación física de la placoda olfativa se practicaron en individuos con suficiente desarrollo como para diferenciar morfológicamente esta estructura, por lo tanto, no debe descartarse que las células precursoras GnRH1 y GnRH3 pueden tener otro origen y colonizar la placoda olfativa después de su aparición (188).

Murakami, S. y sus colaboradores (2002) (225) proponen, a partir de estudios en embriones de pollo, que la ruta migratoria de las células GnRH está en correlación no sólo con su origen embrionario sino también con su rol fisiológico. En consecuencia aquellas neuronas que migran sobre los nervios vomeronasales se diferencian hacia células neuromoduladoras (GnRH3) y son derivadas de la cresta neural craneal, mientras que las neuronas localizadas sobre el nervio terminal y el telencéfalo (GnRH1) se diferencian hacia neuronas secretoras del hipotálamo y son derivadas de la placoda adenohipofisiaria (225).

Las ablaciones en el estadio de placa neural en los embriones del pollo demostraron la pérdida de neuronas sensoriales olfativas sin pérdida o modificación de las neuronas GnRH1 en el encéfalo. Sin embargo, la ausencia del epitelio respiratorio, el cual se origina de la región más rostral de la placa neural tampoco resultó en la pérdida de las células GnRH1 del encéfalo (199, 219). En consecuencia, las células GnRH1 en el pollo aparentemente se originan de los límites anteriores de los pliegues neurales, región que también da origen a los precursores de la placoda de la pituitaria anterior.

La variante estructural GnRH2 como manifestamos anteriormente, es una forma originalmente aislada del cerebro de pollo (chGnRH2). Ha sido enunciada en las seis clases de la superclase gnathostomata de animales (31) y su origen no parece tener relación con la placoda olfativa (195). Algunos trabajos sugieren que esta población neuronal tiene su origen en algún sector, aun no caracterizado, de la región mesencefálica del tubo neural, que forma células desde la zona germinal vecina al tercer ventrículo (221, 226). Sin embargo, algunas

investigaciones asocian el origen de las células GnRH2 con la cresta neural cefálica (25, 220). La presente situación sugiere que tanto las neuronas GnRH2 del mesencéfalo como las neuronas GnRH3 del nervio terminal se originan del dominio craneal de la cresta neural. En anfibios se encontró la presencia de GnRH2 en los ganglios simpáticos derivados de la cresta neural, lo que reforzaría esta teoría.

### **1.5.3. Origen y migración de las neuronas GnRH en mamíferos**

En diferentes órdenes y especies de mamíferos, tales como el ratón (*Mus musculus*) (126, 190, 208-210, 212), la rata (*Rattus norvegicus*) (190, 213, 227, 228), el cobayo (*Cavia porcellus*) (211, 213), los ovinos (*Ovis aries*) (81, 106, 118, 123), diferentes especies de primates, incluido el humano (108, 229-232) y en los porcinos (*Sus scrofa*) (233, 234) se han realizado estudios que describen, en forma completa o parcial, el origen y la ruta migratoria del sistema neuronal GnRH.

La ablación de la placoda olfativa en embriones de ratón es seguida por la pérdida de neuronas GnRH-ir (195, 215, 216). Además, también se demostró la presencia de neuronas GnRH-ir en cultivos celulares de tejidos de la placoda olfativa de ratón (206), de rata (207), de ovinos (106) y de monos (108).

Los estudios realizados con ablación física de la placoda olfativa o con ablación genética de la misma placoda de ratones resultaron en la pérdida de la población de células GnRH. El ratón mutante de ojos pequeños (*Sey*), el cual resulta de la mutación del gen *Pax6*, muestra una ausencia genética de la placoda olfativa. Los ratones *Sey* homocigotas carecen de ambas placodas olfativas y en ellos no se detectan neuronas GnRH (196, 218).

La ablación de la placoda olfativa en la rata no resulta en la pérdida total de las neuronas GnRH del área septal, lo cual podría sugerir que parte de la población de las neuronas GnRH se originarían localmente (227, 235).

En humanos, el síndrome de Kallmann se caracteriza por la presencia de anosmia e hipogonadismo resultante del déficit en GnRH. Este síndrome es otra evidencia para sugerir que en los primates el origen y de la migración de las células GnRH es similar a lo observado en otras especies. Este síndrome es consecuencia de las mutaciones en el gen que codifica anosmin-1 (*KAL 1*) que resulta en la forma de síndrome de Kallmann (KAL 1), mientras que las mutaciones en el gen que codifica el gen del receptor -1 para el factor de crecimiento fibroblástico (FGFR1) resulta en una forma autosomal dominante del síndrome de Kallmann (KAL2). Los fetos con síndrome KAL1 muestran una falta de crecimiento de los nervios olfatorios durante el desarrollo que puede contribuir a fallas en la migración de las células GnRH.

Las neuronas GnRH en los embriones de ratón se detectaron por técnicas inmunohistoquímicas, en el día 10-11,5 de la gestación, en el epitelio de la parte medial de la placoda olfativa, sector que incluye el primordio del órgano vomeronasal (109, 208-210, 212). Las células GnRH-ir migran fuera del epitelio sobre los axones del nervio terminal y de los nervios vomeronasales, cabe consignar que en embriones de esta edad no se detecta inmunomarcación en el prosencéfalo embrionario. Hacia los 12-13 días de gestación, las células GnRH-ir se encuentran ubicadas sobre los nervios mencionados en el trayecto que va desde el órgano vomeronasal y de la placoda olfatoria hasta la parte rostral del telencéfalo (109, 208-210). Los trabajos sugieren que en los embriones de 12 días ya se ha formado todas las neuronas GnRH-ir (109, 126) posibles y a partir de esta edad se observa un mayor número de neuronas de GnRHir en el encéfalo dada la migración desde la región nasal. Las neuronas



GnRHir forman un arco desde el septum hasta el área próptica en los embriones de 14 días de edad (109, 126, 208). Los embriones de 16 a 20 días de desarrollo poseen el mayor acúmulo de células GnRH-ir en las áreas septales y en el POA (109, 208).

Los eventos de la migración de las neuronas GnRHir en la rata son similares a los observados para el ratón. Los embriones de 13,5 días poseen un pequeño número de células en proceso de migración cercanas al órgano vomeronasal. En el día 14,5 las células GnRH-ir están ascendiendo por el nervio terminal y sus fibras penetran en la superficie medial de la vesícula prosencefálica (208, 227). El proceso migratorio de las células GnRH-ir las ubica sucesivamente en el tubérculo olfatorio, luego en el septum, y finalmente llegan a su posición definitiva en el POA entre los días 16,5-17,5 (197, 208, 227, 228). En embriones de cobayo, las neuronas GnRH-ir se visualizaron originalmente en la mucosa nasal, entremezcladas con fibras del nervio olfatorio (211, 213), luego, fueron detectadas en el día 28 de gestación sobre las fibras del nervio terminal (211). En los fetos de 30 días de desarrollo, las neuronas GnRH-ir ya se encontraban localizadas en la banda diaonal de Broca, la lámina terminal y el área preóptica (211).

En embriones de primates no humanos (*Macaca mulatta*), se identificaron dos poblaciones celulares GnRH-ir, ambas originadas en la placoda olfatoria. Sin embargo, el momento de aparición entre ambas es diferente; las neuronas GnRH-ir de aparición temprana colonizan el septum, el área preóptica, la estría terminal, la amígdala y el claustró; mientras que las de aparición más tardía migran para ubicarse en el núcleo arcuato en la región del hipotálamo mediobasal (231).

En fetos de monos rhesus las células GnRH-ir fueron detectadas a partir del día 36 de gestación (113). Este estadio se caracteriza por la presencia de células GnRH-ir en el epitelio nasal y en el trayecto de los nervios dentro de la cavidad nasal. Sin embargo, los mismos

autores señalan la existencia de fibras GnRH-ir en la cavidad nasal, en la parte lateral del área preóptica e hipotálamo medio basal. Las primeras células GnRH-ir detectadas en el interior del encéfalo de macacos se describen en el día 38 de gestación y son evidentes en los bulbos olfatorios y la porción encefálica del nervio terminal. Durante los días 40-41 del desarrollo se observa un incremento de las fibras y células GnRH-ir, las cuales se distribuyen principalmente en el área septal, el área preóptica y en menor medida en el área hipotalámica anterior. Por otro lado, el mayor acúmulo de fibras GnRH-ir se encuentra en el hipotálamo basal vecino a la eminencia media. En los días 45-47 de gestación las neuronas GnRH-ir se ubican en la porción intracraneal del nervio terminal y en forma escasa en la región del tubérculo olfatorio y en el área septal. Paralelamente, el número de somas neuronales GnRH-ir se incrementa en el área preóptica y en el área hipotalámica anterior, así también se visualizaron las primeras células GnRH-ir en la región del hipotálamo mediobasal. Durante el día 50 del desarrollo fetal se encontraron células GnRH-ir en el septo nasal, pero no en el epitelio nasal, en el nervio terminal y en forma escasa en la región del tubérculo olfatorio y el área septal. En el área preóptica y el área hipotalámica anterior, las neuronas y fibras GnRH-ir son abundantes, principalmente laterodorsal al quiasma óptico, mientras que en la región del hipotálamo mediobasal las estructuras GnRH-ir se ubicaron dorsomedial al tracto óptico. En esta etapa del desarrollo, se observa la extensión de las primeras fibras GnRH-ir hacia la eminencia media. Para los fetos de 55 días de gestación no se encontraron diferencias significativas en la ubicación de las neuronas y fibras GnRH-ir con respecto a aquellos de 50 días. Finalmente, en fetos de 135 días de gestación no se hallaron fibras GnRH-ir dispersas en el septo nasal, en el tubérculo olfatorio y en el área septal. En el área preóptica, las neuronas GnRH-ir se encontraron en alta concentración en la vecindad del órgano vasculoso de la lámina terminal. Sin embargo, la mayor concentración de somas neuronales se encuentra en el

hipotálamo mediobasal, específicamente en la porción lateral del núcleo arcuato, dorsal a la parte tuberal de la hipófisis (113). Por otro lado, la mayor concentración de fibras GnRH-ir es evidente como una red en la eminencia media.

En embriones humanos de 42 días, las células GnRH-ir se observaron en el epitelio del primordio olfatorio medial, asociadas a los nervios terminal y vomeronasal (230). En embriones de 12 y de 19 semanas de edad gestacional (no se consignan datos en las semanas intermedias), se visualizaron neuronas GnRHir relacionadas con el órgano vomeronasal y en el trayecto de los nervios vomeronasal y las fibras GnRH-ir formaron fascículos nerviosos desde el órgano vomeronasal hasta su finalización en la cara medial del bulbo olfatorio del feto (230, 232). En fetos humanos de 22 semanas de gestación, las neuronas GnRH-ir estaban presentes en la parte superior del septo nasal, en los fascículos nerviosos que cruzan la lámina cribada del etmoides, pero no fueron detectadas en la cavidad nasal de fetos de 23 y 36 semanas de edad (232).

#### **1.5.4. Origen y migración de las neuronas GnRH en especies de interés productivo**

La migración de las neuronas GnRH en especies de interés productivo se encuentra descripta principalmente en la especie ovina (81, 118, 123) y en menor medida en la especie porcina (233, 234).

La edad embrionaria/fetal de la primera inmunomarcación de neuronas GnRH-ir cuando se utiliza el anticuerpo 2-10 antiGnRH, el cual reconoce solamente el decapeptido libre en el citoplasma, parece variar según el procesamiento del tejido utilizado (81). En ovinos utilizando cortes parafinados se logró la inmunomarcación de las neuronas GnRH-ir a partir del día 52 del desarrollo fetal (81). En cambio, en cortes obtenidos con criostato y sumando un detergente (tritón-X100) a las soluciones tampon, se evidenciaron células GnRH-ir en el

encéfalo a partir del día 36 de edad de gestación (118). En este momento del desarrollo también se observaron neuronas y fibras GnRH-ir en otras áreas tales como el nervio terminal (en su trayecto intracraneal), el tubérculo olfatorio medial y la cavidad nasal. Es una particularidad señalada por Caldani y sus colaboradores (1988) (81, 118), que en los ovinos siempre que se detectó inmunomarcación de neuronas sobre el nervio terminal, también aparecían elementos GnRH-ir (fibras, neuronas o ambos) en sectores encefálicos.

Las neuronas GnRH-ir, en los días 35-40 del desarrollo fetal ovino, se detectaron en la cavidad nasal en una localización similar a la de los fetos de ratones sugiriendo una asociación con elementos del nervio terminal y el órgano vomeronasal. También se observaron neuronas GnRH-ir y engrosamientos de fibras inmunomarcadas en áreas tales como el nervio terminal, el tubérculo olfatorio medial, sobre la pared meníngea telencefálica ventral, formando un denso plexo alrededor de los bulbos olfatorios y más hacia caudal asociadas a la arteria cerebral anterior (81). Además, para el mismo período del desarrollo fetal se encontraron inmunomarcaciones en células de la epidermis que cubre la región frontal de la cabeza y la porción caudal del techo de la cavidad nasal (81).

Durante la sexta semana de gestación (40-43 días), las neuronas GnRH-ir se encontraron sobre la parte medial del tubérculo olfatorio, en el septum anterior, en el área preóptica (parte basal) y núcleos del hipotálamo lateral. Las fibras GnRH-ir también se visualizaron en el área preóptica (parte mediodorsal) y en el hipotálamo mediobasal. En este estadio del desarrollo, el órgano vasculoso de la lámina terminal contenía pocas fibras y no se detectaron en la eminencia media.

En los fetos de 49 días, las neuronas GnRH-ir se localizaron en el nervio terminal, tubérculos olfatorios, área preóptica y área septal, estría tálamomedular, estría terminal, habénula, fascículo retroflexus y núcleo interpeduncular. Subsecuentemente, los cuerpos celulares

GnRH-ir invadieron progresivamente las diferentes partes de las regiones preópticas hipotalámicas entre los días 49 y 62, llegando a visualizarse fibras inmunorreactivas en los cuerpos mamilares. En los fetos ovinos de 52 a 70 días de desarrollo, las neuronas GnRH-ir se localizaron en el área preóptica, en alta concentración alrededor del órgano vasculoso de la lámina terminal y ocupando planos más laterales cerca de la comisura anterior y el septo medial. Se encontraron escasas neuronas GnRH-ir extrahipotalámicas en este período (día 54 y 57), aunque se citan como elementos aislados, en el núcleo medial de la amígdala y en los bulbos olfatorios (118)

Las fibras GnRH-ir observadas en fetos de 49-70 días se ubican en las mismas regiones que los somas neuronales y se describe un incremento progresivo de la densidad las mismas. Al principio, aparecen concentradas en el área preóptica y en el órgano vasculoso de la lámina terminal, pero más tarde se extienden hasta el hipotálamo mediobasal. Las fibras en su mayoría aparecen orientadas en sentido rostrocaudal siguiendo un trayecto ligeramente descendente hacia la eminencia media. Si bien las fibras son escasas, en fetos de 56-58 días, se observó un incremento progresivo de la densidad fibrilar, principalmente hacia el día 63-65 del desarrollo. En fetos ovinos de 70 días de gestación, además de las localizaciones mencionadas, se observan fibras GnR-ir en los bulbos olfatorios y en la estría tálamo medular. Sin embargo, no es evidente la presencia de fibras GnRH-ir en el tallo hipofisiario antes del día 97 del desarrollo fetal (118).

Caldani, y col., (1995) (118) hacen referencia a que en fetos de 80 días o mayores de edad gestacional es posible no observar inmunomarcaciones de somas celulares de GnRH-ir. En fetos de 75 a 110 días de edad gestacional, la distribución de las estructuras GnRH-ir fue similar a la observada en ovejas adultas y no se encontraron diferencias en la distribución de

las neuronas y fibras GnRH-ir entre ambos sexos (118, 123). En los ovinos, el sistema GnRH aparece morfológicamente completo un poco antes de la mitad de la gestación (118).

La migración de las neuronas GnRH en los porcinos (*Sus scrofa*) fue observada en embriones a partir del día 40 poscoito. En este estadio se observó una concentración de los cuerpos celulares GnRH-ir en las áreas vecinas a las estructuras del sistema olfatorio (bulbo y tubérculo olfatorio) y por delante de la comisura rostral. A los 50 días los somas GnRH-ir son evidentes en proximidad del órgano vasculoso de la lámina terminal (233). Sin embargo, Polkowska, J. (1985) describe que las neuronas GnRH-ir sólo fueron observadas a partir del día 72 del desarrollo fetal, localizadas preferentemente en el nervio terminal, la eminencia media y el órgano vasculoso de la lámina terminal (234). Según las observaciones del citado autor, en este periodo las fibras GnRH-ir aparecen en la eminencia media asociadas a los vasos del sistema porta. La población de neuronas GnRH-ir en la especie porcina fue poco numerosa hasta la mitad del período gestacional. Sin embargo, existe un marcado incremento en los últimos días de gestación (110 días) (233, 234), de manera, que los somas se distribuyen principalmente en el núcleo periventricular del hipotálamo anterior, el área preóptica, la banda diagonal de Broca y en pequeño número en el hipotálamo mediobasal (234).

### **1.5.5. Factores y sustancias involucrados en la migración de las neuronas GnRH**

#### **1.5.5.1. Aspectos generales**

El proceso migratorio que llevan a cabo las neuronas GnRH está guiado por diferentes factores moduladores, tanto aquellos que actúan en forma directa sobre las neuronas GnRH o indirectamente a través de la extensión de los axones del sistema olfatorio. Estas sustancias bien pueden tener un origen externo a las neuronas GnRH o bien sintetizadas por ellas. Esto

incluye a moléculas relacionadas a la interacción de superficie celular (receptores de membrana, moléculas de adhesión, moléculas de matriz extracelular), moléculas secretadas (neurotransmisores, péptidos, sustancias quimioattractivas y quimiorrepelentes) y factores de transcripción (236). Existe una diversidad de moléculas que intervienen en el proceso de migración y podrían ser clasificadas tanto desde su estructura química, como desde su función, origen o lugar de acción (Tabla 5).

Estas sustancias no actuarían en forma conjunta a lo largo del proceso migratorio sino que cada una de ellas, o bien algunas, actuarían sobre tramos específicos de la ruta migratoria de las neuronas GnRH. Las neuronas GnRH no son una población homogénea, clonada, de hecho son un grupo bastante heterogéneo en su expresión de algunos mRNAs, proteínas, receptores y otras moléculas, las cuales conforman una red neuronal. El concepto de múltiples subpoblaciones de neuronas conformando una red neuronal es crucial para la identificación y el estudio de nuevos factores implicados en el proceso de migración de las neuronas GnRH (237-239).

Los desórdenes del desarrollo y de la reproducción debidos a defectos en la producción de GnRH pueden ser causados por múltiples mecanismos, incluyendo un déficit en la producción de GnRH o una migración defectuosa de las neuronas GnRH, lo cual puede incluir mutaciones neuronales en el gen GnRH, producción deficiente en las moléculas de adhesión o migración celular y alteraciones secretorias de las proteínas que actúan en las direcciones a seguir durante el proceso de migración (239).

#### **1.5.5.2. La migración desde la placoda hasta el extremo caudal de la cavidad nasal**

Distintos factores de transcripción median la migración de las neuronas GnRH desde el origen mismo de estas células. Estos factores inductivos se encuentran involucrados en la inducción

de la placoda olfatoria (236) y en el proceso mismo de migración. A manera de ejemplo podemos considerar la importancia del factor de transcripción Ebf2 que afecta la migración de las neuronas GnRH. Este factor es expresado por las propias neuronas (240) y en ratones mutantes se confirmó que tiene un rol importante en las fases iniciales de la migración, ya que en esos animales se observó un gran agrupamiento de células GnRH-ir en el mesénquima nasal con ausencia casi completa de estas en el hipotálamo y ausencia también de proyecciones neuronales hacia la eminencia media. Consecuentemente los ratones fueron hipogonadales, estériles frente al servicio con ratones tipo silvestres y se considera como una posible causa de hipogonadismo normosmico (240).



**Tabla 8.** Moléculas que actuarían en el proceso de migración celular de las neuronas GnRH (Adaptado de Tobet, S. y Schwarting, G. 2006) (236).

---

**Moléculas secretadas por las neuronas GnRH**

GABA

Norepinefrina y serotonina

Colecistoquinina

FGF

Netrina-1

Gas6

Factor de crecimiento hepatocitario (FGH)

Factor neurotrófico asociado al cerebro

Factor-1 asociado al estroma

**Proteínas de superficie celular de las neuronas GnRH**

Receptor GABA A

cMet (receptor de HGF)

Ephrina 5 y Tirosinquinasa

Receptor de FGF

Receptores de epinefrina serotonina

Receptor de colecistoquinina

Receptor de Netrin-1

Factor LHRH embrionario nasal (NELF)

Receptor de GnRH

Proteínas lactosamina terminal

Tag-1 Glicoproteína de dirección neuronal

N-VGCC Canal de calcio tipo-N

**Otras proteínas de superficie celular no GnRH**

Anosmina (Kal-1)

Molécula de adhesión celular neuronal polisiática

Receptor Netrina.1

**Matrix extracelular**

Heparan sulfato

**Proteínas en el citoplasma de las neuronas GnRH**

Proteína reguladora de la señal extracelular

Kinasa/MAPK

GAP

Galanina

**Factores nucleares**

eminencia mediaFs

Oct1, Dlx, Msx, NSCL2, Ebf2, GATA4 y otros

Receptores de estrógenos

---

Las citoquinas y quimioquinas son moléculas que intervienen en el proceso de migración de las neuronas GnRH desde la placoda olfativa y durante su migración por el compartimiento nasal (241). Se ha demostrado en cultivos celulares que estimulan la quimiotaxis de las neuronas GnRH, por activación independiente de distintas rutas intracelulares (242). Una de las tantas moléculas descritas es el factor-1 derivado de células del estroma (SDF-1), una quimioquina, que se encuentra expresada en el mesénquima nasal. Su concentración es baja en la proximidad del órgano vomeronasal pero alta en la región cercana a la lámina cribada del etmoides. El SDF-1 ha sido propuesto como un factor importante en las fases iniciales de la migración, ya que se comprobó que en ratones mutantes carentes del receptor para SDF-1 existe un impedimento para que las neuronas GnRH se trasladen desde la región del órgano vomeronasal. De manera que pocas neuronas GnRH-ir aparecen en el encéfalo de esta variedad mutante (243).

Se sugiere que durante la migración a través de la cavidad nasal, muchos factores solubles como citoquinas y quimioquinas podrían actuar sinérgicamente para promover la salida de las neuronas GnRH de la placoda y migrar a través del mesénquima nasal (237, 238, 241, 243-245).

Recientemente, las monoaminas, como la serotonina, fueron examinadas para observar su influencia sobre la migración de las neuronas GnRH. Se demostró que la administración de inhibidores de serotonina o de síntesis de catecolaminas en ratas preñadas enlentecía la migración de las neuronas GnRH (246) y en ratones deficientes en enzimas que degradan las monoaminas existe un aumento de inhibidores de serotonina y de la producción de norepinefrina en el cerebro (247).

Diversos autores han estudiado el rol de las moléculas de adhesión celular neuronal y proteínas relacionadas tales como tenascina, laminina y fosfocan en el proceso migratorio de

las neuronas GnRH. La tenascina y la laminina juegan un rol en la migración neuronal olfatoria y por lo cual tienen una influencia indirecta en el movimiento neuronal GnRH (248).

### **1.5.5.3. La migración en la intersección naso-encefálica**

Para alcanzar las regiones ventrales del encéfalo en desarrollo, las neuronas GnRH deben atravesar la zona nasoencefálica, en otras palabras, deben abandonar la porción más caudal del mesénquima nasal, atravesar la lámina cribada del etmoides y penetrar en el prosencéfalo. De esta situación se desprende que habrá una conjunción de situaciones y sustancias que promueven la migración de las neuronas GnRH y la elongación de los axones olfatorios a través de la lámina cribada del etmoides (237, 238). Se ha propuesto que ocurre en este sitio, una pausa en la migración, justo antes de penetrar al encéfalo. Esta pausa temporal podría ser necesaria para permitir la guía de los axones que se elongan hacia las regiones del hipotálamo en formación, o bien una pausa necesaria para una maduración neuronal (249). En cualquier caso, la presencia de señales negativas pueden ser necesarias para enlentecer la migración de las células GnRH. Además, las moléculas repulsivas en la proximidad del bulbo olfatorio pueden tener un rol crucial previniendo la migración de la mayoría de las neuronas GnRH dentro del bulbo olfatorio accesorio y guiarlas hacia las áreas basales del encéfalo. (237, 238, 249).

Existen evidencias que sugieren que tanto el neurotransmisor ácido g-aminobutírico (GABA) como el neuropéptido colecistoquinina (CCK) son importantes en el pasaje de las neuronas GnRH a través de la lámina cribada del etmoides. La CCK se expresa en las células olfatorias y en los axones que guían la migración de las neuronas GnRH. En las neuronas GnRH se expresan receptores CCK-1 los cuales son de importancia para la transducción de señales que determinan el tiempo correcto de entrada al encéfalo (250).

El límite naso-encefálico sería un punto crucial en la migración de las neuronas GnRH donde diferentes señales actuarían como guía espacial y temporal para la entrada de las neuronas GnRH en el encéfalo (251).

Las neuronas GnRH ingresan en primer lugar al bulbo olfatorio acompañando a los nervios (terminal y vomeronasales). Sin embargo, desde esta posición la migración debe conducir las hasta su localización en los núcleos hipotalámicos específicos. Un elemento señalado como guía para este fenómeno es la inflexión de la rama caudal del nervio vomeronasal asociada con proteínas como las netrinas (252). En los ratones mutantes carentes del receptor de netrina-1 se produce una falla en la dirección de las fibras que forman el nervio vomeronasal y paralelamente se constata que las neuronas GnRH migran desorganizadamente en el cerebro (252, 253).

La reelina, una proteína de matriz extracelular, tiene funciones en la migración neuronal y en la laminación de las cortezas cerebral y cerebelosa, por lo cual podría tener un rol sobre las neuronas GnRH en la región del bulbo olfatorio (254). La reelina se expresa altamente en el sistema olfatorio, especialmente en el bulbo olfatorio y en la región donde penetran las neuronas GnRH en el encéfalo. Encéfalos embrionarios tratados con anticuerpos bloqueadores de reelina muestran una alteración de la ruta migratoria de estas neuronas desde la región olfatoria hasta el prosencéfalo secundario, además, los ratones adultos de ambos sexos que recibieron este tratamiento contenían significativamente una menor cantidad de neuronas GnRH (251).

#### **1.5.5.4. La migración en el encéfalo**

Desde el bulbo olfatorio las neuronas GnRH migran hacia los núcleos del hipotálamo en contacto con los axones del nervio vomeronasal, luego se separan de ellos y, ya alojadas en su destino final, proyectan sus axones hacia la eminencia media y el órganovascular de la

lámina terminal. Neurotrasmisores, tales como el glutamato y el GABA, han sido propuestos como factores determinantes en los períodos finales de la migración de las neuronas GnRH y en la formación e integración del circuito hipotálamo-hipofisiario (255, 256). El GABA, sintetizado por las propias neuronas GnRH, influye sobre la migración e incrementa la diversidad posicional al final del proceso migratorio, así como modula el proceso de extensión de las fibras hacia la eminencia media (256). Uno de los receptores del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), también ha sido señalado como una molécula importante para la extensión de los axones GnRH hacia la eminencia media, así como, en el proceso de establecer los contactos con los vasos del sistema porta necesarios para la liberación hormonal (256). Se comprobó que la disminución de la expresión del receptor 1 del FGF en las neuronas GnRH del ratón determina una disminución del 30% de estas células en el encéfalo y una significativa reducción de las proyecciones GnRH hacia la eminencia media (257).

El GABA, así como otras moléculas que se encuentran en las neuronas GnRH, no se detecta en todas estas neuronas sino que aparece en una subpoblación específica. En cultivos primarios de neuronas GnRH puede inhibirse la migración de un 25% de las neuronas con agonistas del receptor GABA-A (muscimol, bicuculline y otros) (239). De la misma forma, existe evidencia de que estas sustancias también alteran la ubicación de los somas de las neuronas GnRH y la interacción con las fibras guías (239).

## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **2.1. Objetivos**

Se plantearon los siguientes objetivos:

- Aplicación de la técnica de inmunohistoquímica para caracterizar la población de neuronas reguladoras de los acontecimientos reproductivos.
- Comprobar si el anticuerpo monoclonal LRH13 es capaz de marcar las neuronas GnRH del sistema nervioso central en embriones, fetos y bovinos post-natales.
- Investigar el origen embriológico y describir la ruta de migración de las neuronas GnRH durante las etapas embrionarias y fetales, e identificar la localización final de la población neuronal en el encéfalo bovino.
- Investigar y describir la distribución anatómica del sistema de fibras y las neuronas GnRH en bovinos (*Bos Taurus*) y compararla con las descripciones realizadas para otras especies de rumiantes (ovinos y caprinos).

### **2.2. Hipótesis**

- Las neuronas que producen y almacenan GnRH en la especie bovina (*Bos taurus*), se originarían y diferenciarían en el epitelio olfatorio del embrión. Posteriormente, migrarían a través del nervio olfatorio para finalmente distribuirse en los núcleos del hipotálamo rostral.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material biológico (embriones y fetos)**

En la Argentina la industria frigorífica, en especial la del ganado vacuno, es una sencilla, económica y abundante fuente de material para estudios relacionados con temas de embriología. Por un lado, es frecuente el sacrificio de hembras gestantes con embriones o fetos del primer tercio de desarrollo; por el otro lado, la prohibición de utilizar los animales nonatos para el consumo es un factor que obliga a descartar estos ejemplares. Además, la mecánica de la faena permite tener acceso al útero gestante sólo algunos minutos después del sacrificio de la res. Sin embargo, es importante tener presente, que no siempre es posible obtener una cantidad apropiada de embriones o fetos de edades correctamente escalonadas y que la aparición de hembras gestantes en la playa de faena sufre una variación estacional muy marcada.

Por estas razones y comprometidos en dar cumplimiento a la normativa referida al uso de animales de investigación, todo el material biológico utilizado en esta tesis fue obtenido en frigoríficos y mataderos habilitados. El mismo fue recolectado de hembras bovinas gestantes de distinta raza y peso corporal y luego este material fue clasificado según la edad estimada de desarrollo.

##### **3.1.1. Obtención de embriones, fetos y terneros**

El total de embriones (n=16) y fetos (n=26) fue obtenido de animales de faena del frigorífico Frigorina, situado en la localidad de Gorina, partido de La Plata. Se obtuvieron embriones y fetos desde el día 25/28 (4<sup>ta</sup> semana) hasta el día 150 (21-22<sup>a</sup> semana) de edad gestacional. Los ejemplares obtenidos se agruparon con el siguiente intervalo:  $\leq 4^{\text{ta}}$  semana (n=4); 5<sup>ta</sup>

semana (n=6), 6<sup>ta</sup> semana (n=6), 7<sup>ma</sup> semana (n=10), 8<sup>va</sup> semana (n=5), 10-11<sup>a</sup> semana (n=3), 12<sup>a</sup> semana (n=2); 16-18<sup>a</sup> semana (n=4); 21-22<sup>a</sup> semana (n=2).

El reconocimiento de los úteros gestantes se realizó mediante palpación en las bandejas de acero de la cinta de traslado visceral. La extracción de los embriones o fetos se efectuó mediante la práctica de una incisión en el cuerno gestante, luego se separaron y cortaron las membranas fetales y finalmente se seccionó el cordón umbilical. Las muestras fueron trasladadas en un recipiente hermético a una temperatura entre los 10° y 15°C en una solución PBS (Anexo I).

Para completar el estudio fueron sacrificados dos terneros machos prepúberes (edad aproximada de 4 meses), de raza Holando Argentino, con un peso vivo de 96 y 113 Kg respectivamente. Los terneros fueron obtenidos de un tambo de la localidad de Brandsen, Pcia de Buenos Aires. Los animales fueron tranquilizados (clorhidrato de xilacina 0,2 mg/Kg IM, Laboratorio Richmond), anestesiados con pentotal sódico IV 20 mg/Kg (Laboratorio Abbott), seguido de ketamina IV 15 mg/Kg (Laboratorio Holliday Scout) y luego sangrados a blanco. Ambos ejemplares fueron eutanasiados en la Sala de Necropsia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

### **3.1.2. Determinación de la edad embrionaria y fetal**

Para la estimación de la edad embrionaria y fetal (Figura 13) se utilizaron las ecuaciones enunciadas por Kähn (153) (Tabla 8). De manera que en primer término se procedió a medir en todos los embriones y fetos la longitud céfalo caudal (LCC). A partir de la 8<sup>va</sup> semana de gestación, el desarrollo de las estructuras embrionarias-fetales permite la medición del diámetro biparietal (DBP), del largo del fémur y del diámetro de la órbita (Figura 14 A y B). Las mediciones fueron realizadas mediante un calibre y una cinta métrica metálica. La LCC



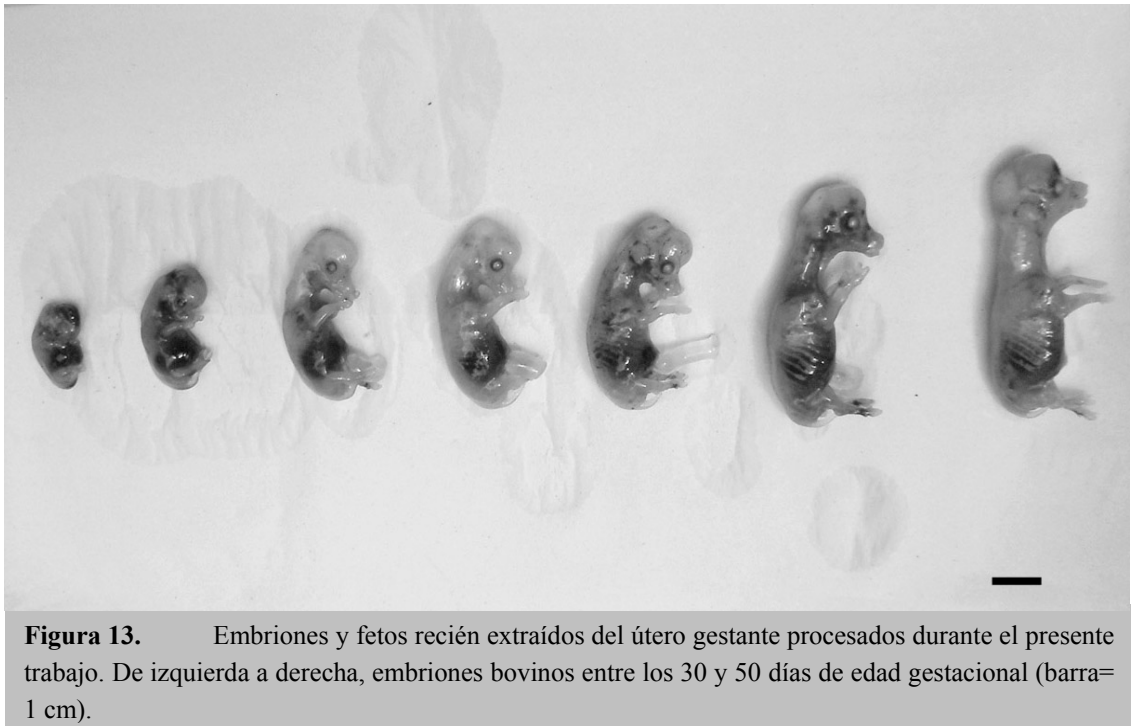
se tomó desde el extremo más rostral del embrión-feto hasta el nacimiento de la cauda con una línea recta (Figura 14 A). Por otro lado el DBP se midió como la distancia desde la parte más lateral de una órbita a la del lado opuesto.

La edad de los embriones y fetos, hasta los 60 días de gestación, fue estimada a partir de la medida del LCC, mientras que en los fetos mayores a 60 días de edad gestacional se estimó a partir del promedio de las medidas LCC, DBP, diámetro de la órbita y largo fetal.

**Tabla 9.** Determinación de la edad fetal en bovinos. Ecuaciones de regresión (Kähn, 1994).

Estructura fetal	Ecuación de regresión	Tiempo de intervalo	r
LCC	$y=10,76+0,0199 x^2$	30 – 83	0,99
DBP	$y=13,91+0,523 x$	60-209	0,97
Diámetro de la órbita	$y=13,2+0,315 x-0,00061 x^2$	60-268	0,97
Largo de fémur	$y= -0,74+0,00187 x^2$	60 – 201	0,99

X: edad gestacional; y= medida expresada en mm



**Figura 13.** Embriones y fetos recién extraídos del útero gestante procesados durante el presente trabajo. De izquierda a derecha, embriones bovinos entre los 30 y 50 días de edad gestacional (barra= 1 cm).

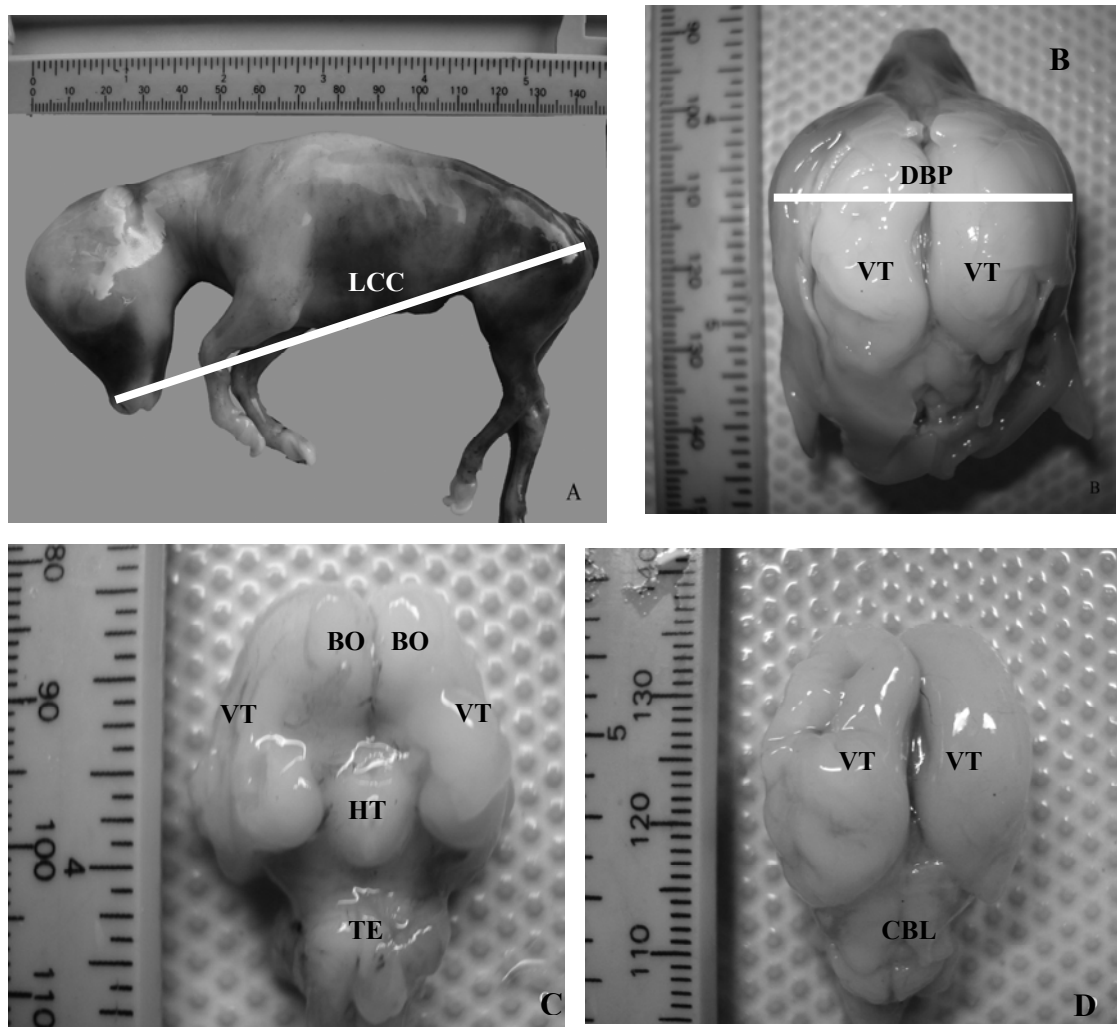


Figura 14. Feto bovino de 11 semanas de edad gestacional. Fotografías A y B Determinación de la edad gestacional. Toma del largo céfalo-caudal (LCC) y diámetro biparietal (DBP) B) Cabeza del mismo feto bovino lavado y fijado. Vista ventral (C) y dorsal (D) del encéfalo luego de extraído de la cavidad craneana. VT: vesícula telencefálica; BO: bulbo olfatorio; HT: hipotálamo; TE: tronco del encéfalo; CBL: cerebelo.

### 3.1.3. Preparación y conservación del material biológico

#### 3.1.3.1. Fijación y extracción del encéfalo

La fijación de los embriones y fetos colectados se llevó a cabo por medio de dos técnicas básicas, acorde con la edad del desarrollo del individuo, por inmersión o perfusión.

##### *Fijación por inmersión en solución fijadora*

Los embriones y fetos recibidos en el Laboratorio de Neurociencias, en primer termino fueron lavados con abundantemente agua corriente y luego se procedió a sumergirlos en una solución

salina de Cl Na (0,9%) en PBS 0,1M (Anexo I) durante 1 hora a 4°C. Luego, el material se fijo por inmersión en una solución de Zamboni (Anexo I) o en solución de paraformaldehído al 4 % en PB 0,1 M, pH 7,4 (Anexo I) durante 6-8 hs.

Los embriones de hasta 5 semanas de desarrollo fueron fijados completos, pero a los ejemplares de mayor edad se les seccionaba la cabeza, la cual se sumergía en solución fijadora.

#### *Fijación por perfusión de la solución fijadora*

A partir de la 10<sup>ma</sup> semana de desarrollo, los fetos se perfundieron a través del corazón o de la arteria aorta descendente. En estos ejemplares se seccionaron las venas yugulares para permitir el drenaje de la sangre y los líquidos de lavaje. La técnica se realizó por resección de la parilla costal izquierda y exposición del corazón y el mediastino caudal. Tanto en la perfusión transcardíaca, como en los casos que se utilizó la arteria aorta, se procedió a la fijación de un catéter, tipo *abbocat*, en el interior del ventrículo izquierdo o del vaso sanguíneo correspondiente. Finalizada esta maniobra, se realizó un lavaje vascular utilizando PBS a 4°C, seguido de la perfusión del líquido fijador (solución de Zamboni o solución de paraformaldehído 4 % en PB 0,1 M, pH 7,4) a 4°C.

El procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente, utilizándose una bomba peristáltica (Syst. Model 7553-75. Cole Palmer Instrument Co) impulsando un volumen de 1-5 ml/min acorde al tamaño fetal. Finalizada la perfusión el material fue sometido a una posfijación en la misma solución por 4-6 hs a 4°C.

En los fetos de mayor tamaño (21-22<sup>da</sup> semana de desarrollo) y en los terneros prepúberes la perfusión se realizó a través de las arterias carótidas, previa separación de la cabeza a través de una incisión realizada en el nivel del surco preescapular. Completado el procedimiento de lavado y fijación, se procedió a la extracción del encéfalo, para lo cual se retiró el techo de la

cavidad craneana por medio de secciones en los huesos parietales, occipital y frontal. Los encéfalos fueron postfijados en la solución fijadora durante 4 horas a 4 °C (Figura 14 B, C y D).

### **3.1.3.2. Almacenamiento y criopreservación del material**

Los embriones, cabezas y encéfalos fijados fueron lavados repetidas veces con PBS para eliminar el exceso de fijador y luego fueron transferidos a una solución crioprotectora de Olmos (Anexo I) que permitió el almacenamiento del material a -20°C hasta su procesamiento final.

### **3.1.3.3. Inclusión del material**

Previo a fraccionar el material en láminas de 50 µm de espesor, las muestras fueron lavadas repetidas veces con PBS para eliminar el exceso de solución criopreservadora y luego fueron incluidas en una solución de gelatina/glicerol (Anexo II) para formar un bloque homogéneo y evitar el desprendimiento de partes de la misma. Los bloques de gelatina conteniendo el material de estudio se endurecieron por inmersión en formol-calcio durante 6 horas y luego se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% durante una noche.

### **3.1.3.4. Sección del material**

Los embriones, cabezas y/o encéfalos fueron seccionados en láminas de 50 µm utilizando un micrótopo manual de congelación de dióxido de carbono (Leitz Co.), con los siguientes detalles:

- a) La parte cefálica de los embriones de  $\leq 4$  semanas (n=4); 5 semanas (n=6) y 6 semanas (n=6) de desarrollo fueron seccionados en forma sagital.

b) Las cabezas completas de los fetos de 7 semanas (n=10) y 8 semanas (n=5) de desarrollo fueron seccionadas en forma sagital (n=10) y horizontal (n= 5).

c) Los encéfalos completos de los fetos de 10-11<sup>er</sup> semanas (n=3), 12<sup>da</sup> semanas (n=2), 16-18<sup>va</sup> semanas (n=2) y 21-22<sup>da</sup> semanas (n=2) de desarrollo fueron seccionados en forma coronal.

d) Los encéfalos de dos terneros prepúberes fueron inicialmente disecados para separar el tálamo e hipotálamo del resto del encéfalo. Se utilizaron dos cortes coronales (rostral al quiasma óptico y caudal al proceso mamilar) y dos cortes sagitales paramedianos (en la mitad del lóbulo piriforme). El bloque obtenido fue seccionado en forma coronal a fin de obtener láminas de 50  $\mu$ m.

Independientemente del sentido del corte (coronal, sagital y horizontal) realizado, las secciones obtenidas se dividieron en una placa *multidish* formando seis serie de secciones equidistantes, de manera que de cada individuo se obtuvieron seis series de láminas separadas 300  $\mu$ m una de la otra (Figura 15).

### **3.2. Diseño experimental**

Debido a la escasa información sobre el número y localización de las neuronas GnRH en los bovinos adultos, en primer término se procesaron los encéfalos de los terneros como testigos de la ubicación definitiva de las neuronas GnRH-ir en el hipotálamo de esta especie. A partir de aquí se procesó bajo las mismas condiciones de incubación y revelado una serie completa de secciones provenientes de un embrión o feto desde la menor edad gestacional ( $\geq 4$  semanas) hasta la primera edad fetal donde se encontraron elementos GnRH-ir (8<sup>va</sup> semana). En la siguiente etapa experimental, en los embriones o fetos con edades comprendidas entre la  $\geq 4$  semana de edad gestacional y la primer edad fetal inmunopositiva se procedió a realizar una

modificación factorial 3x3 de la técnica en el cual se varió la concentración del anticuerpo durante la incubación (1:500, 1:2500 y 1:5000) y los tiempos de incubación (40 hs, 60 hs y 80 hs).

La totalidad de las muestras fue procesada con la técnica de inmunohistoquímica descrita en el punto 3 y Anexo IV. Una serie de cada edad fueron utilizadas para evaluar la presencia de la forma molecular chGnRH II.

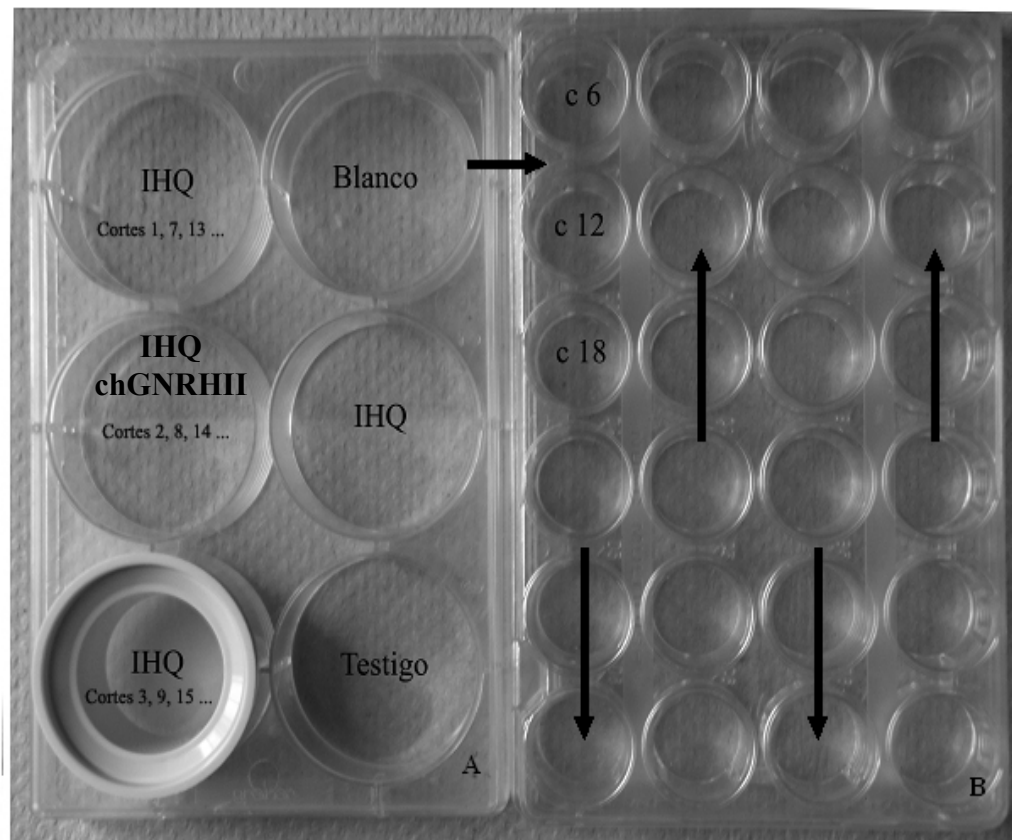


Figura 15. Técnica de inmunohistoquímica, cubetas para la implementación del método de secciones flotantes (free floating sections). A y B) Ordenamiento de la serie de secciones o cortes.

Una serie de secciones representativa de cada estadio del desarrollo fue utilizada como testigo de la inmunohistoquímica (IHQ). Para esta se realizaban los mismos pasos detallados en el protocolo (Apéndice IV) obviando la incubación con el anticuerpo primario. Finalmente, una

serie completa se coloreó con la histoquímica de Nissl, sin someterla a IHQ (testigo blanco), con el fin de utilizarla como referente de la organización anatómica (Figura 15).

### **3.3. Inmunohistoquímica**

#### *Anticuerpo primario*

Se utilizó un anticuerpo monoclonal LHR13 (Biosignal Research Center. Institute for Molecular and Cellular Regulation. Gunma University, Japón) el cual es capaz de reconocer la variedad mamífera de la GnRH. El presente anticuerpo reconoce los sitios alrededor de los AA Ser<sup>4</sup>-Tyr<sup>5</sup> de GnRH por lo que puede reconocer un amplio espectro de GnRH incluyendo los péptidos precursores de la GnRH. Sin embargo, no existe reacción cruzada con la variedad GnRH chicken-II (70).

Para evidenciar la forma molecular GnRH chicken-II se utilizó un anticuerpo policlonal cII675 (conejo) cedido gentilmente por el Dr. Gustavo Somoza.

#### *Técnica de inmunohistoquímica (IHQ)*

Una de cada dos series de secciones equidistantes se procesaron por el método de secciones flotantes (free floating sections) utilizando el sistema peroxidasa-antiperoxidasa (Vector Labs<sup>®</sup>) y diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. En general, se respetaron los pasos y procedimientos descritos por Hamada y colaboradores (137) (Anexo II). En la figura 15 se observa una síntesis del procedimiento utilizado para el muestreo mientras que la figura 16 resume la técnica de IHQ empleada.

Una vez procesadas las secciones de acuerdo al protocolo de IHQ, las mismas se montaron con pincel sobre portaobjetos tratados con gelatina (Anexo II) y se reservaron durante 24 horas para su secado a temperatura ambiente (20°C). Una vez secos se procedió a realizar la coloración de contraste (258), la deshidratación y el montaje definitivo con DPX (Surgipath Medical Industries, Inc.; Richmond, Illinois, USA) (Anexo IV).

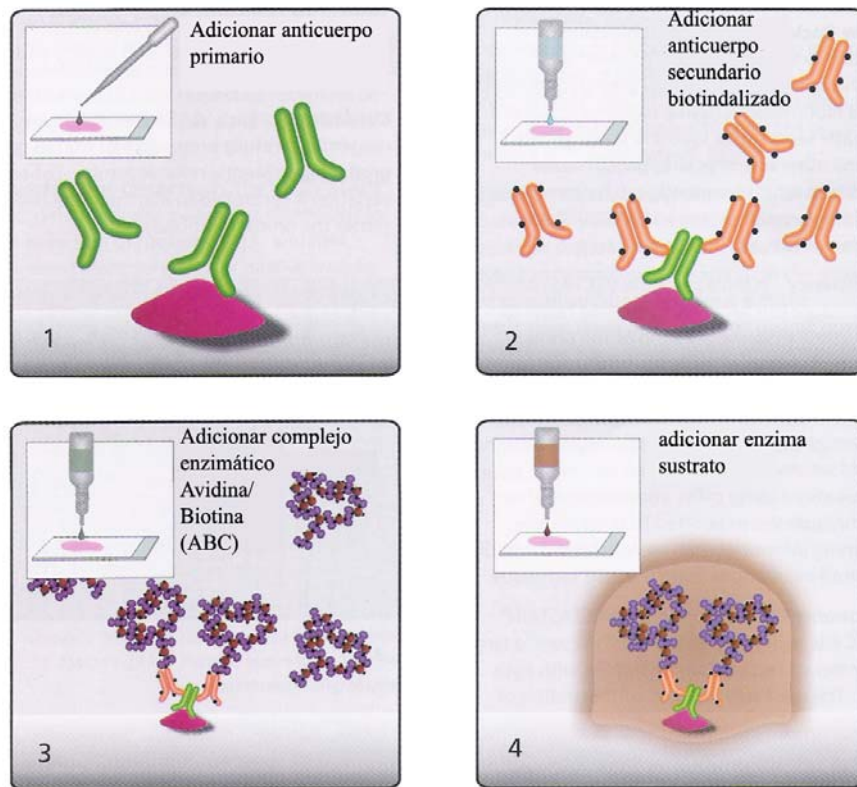
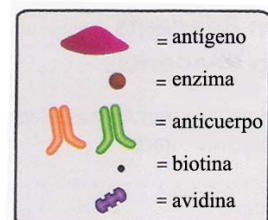


Figura 16. Síntesis del procedimiento de la técnica de avidina/biotina peroxidasa de inmunohistoquímica (Adaptado de Vector Laboratories protocols 2004).





### **3.4. Análisis Microscópico y Captura de imágenes**

Todos los cortes montados y observados (n=2613), cuya cantidad por edad gestacional varió de acuerdo a la cantidad de individuos procesados y a la cantidad de secciones obtenidas, fueron observados con un microscopio binocular (Olympus BX40) equipado con objetivos de 1,25x, 4x, 10x, 20x, 40x y 100x y conectado con una video cámara Sony CCD-IRIS/RGB). Este equipamiento se encontraba anexo a una computadora Power Mac G4.

Las fotografías se realizaron mediante el Software Apple video player y luego se exportaron al software Adobe Photoshop 5.0 y se almacenaron en formato TIFF. Se obtuvieron fotografías que pueden agruparse en dos categorías diferentes de acuerdo con su objetivo: a) Fotografías con 12,5 y 40 aumentos que se utilizaron para reconstruir los sectores del embrión en donde se ubican las estructuras GnRH-ir. b) Fotografías con 200 y 400 aumentos que se usaron para estimar los parámetros morfométricos de las neuronas GnRH-ir.

### **3.5. Análisis cuantitativo de las neuronas GnRH-ir**

El conteo de células inmunorreactivas se realizó de manera manual, sin conocimiento del código utilizado para identificar las secciones. Se utilizaron las imágenes capturadas a magnificaciones de 10x y 20x y con la ayuda del programa Adobe Photoshop 5.0 que permitió identificar mediante círculos de color las células contadas y de esta forma prevenir la omisión o doble conteo de las mismas.

Para estimar el número total de neuronas inmunorreactivas se utilizó el principio desarrollado por Konigsmark con la corrección de Abercrombie (259). Por lo tanto, el número de neuronas estimadas en cada zona analizada se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{1}{ssf} \sum_{i=1}^n x$$

**N:** es el número total de neuronas GnRH-ir estimadas, **ssf** (section sampling fraction): es la relación entre las secciones analizadas y el total de secciones, **x:** representa el número de cuerpos neuronales GnRH-ir contados en cada una de las secciones analizadas.

### **3.6. Análisis morfométrico de los somas GnRH-ir**

Las mediciones de los cuerpos celulares GnRH-ir se realizó en forma semiautomática mediante el software NIH image 1.62. Las imágenes obtenidas a 40x en formato TIFF se exportaron al programa mencionado y luego, se calcularon las siguientes medidas neuronales: eje mayor y menor ( $\mu\text{m}$ ), perímetro ( $\mu\text{m}$ ), superficie ( $\mu\text{m}^2$ ) e índice de redondez (relación entre eje mayor y menor).

### **3.7. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos para la distribución y número de neuronas GnRH-ir fueron analizados mediante la prueba de chi cuadrado y los datos morfométricos de las neuronas GnRHir fueron analizados por análisis de varianza y test de fisher mediante el paquete estadístico SAS<sup>®</sup>

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Aspectos generales del desarrollo del sistema GnRH de los bovinos

Las técnicas utilizadas en la presente investigación resultaron adecuadas para identificar tanto los somas celulares como las fibras GnRH-ir en secciones de tejidos procesadas por IHQ. De la misma forma estos elementos pudieron ubicarse eficazmente en relación con la anatomía embrionaria/fetal a partir de secciones sagitales y horizontales contiguas teñidas con violeta de cresilo (Figura 17).

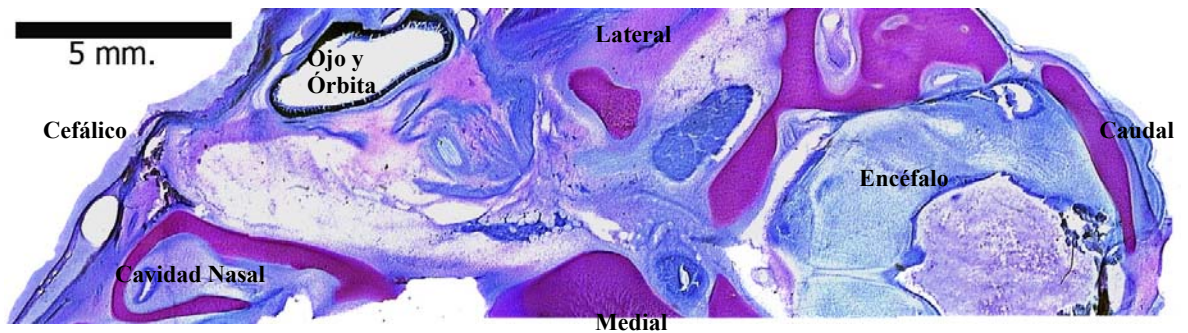
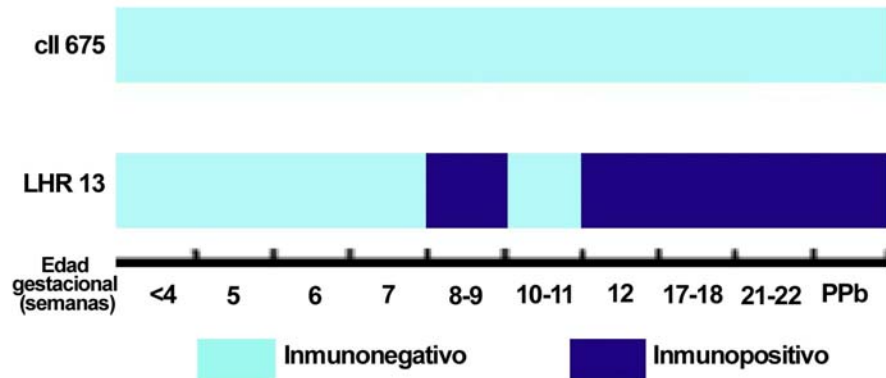


Figura 17. Sección horizontal de un feto de 8 semanas de desarrollo teñida con violeta de cresilo. Reconstrucción realizada a partir de fotografías tomadas con 12.5 aumentos. Barra de 5 mm.

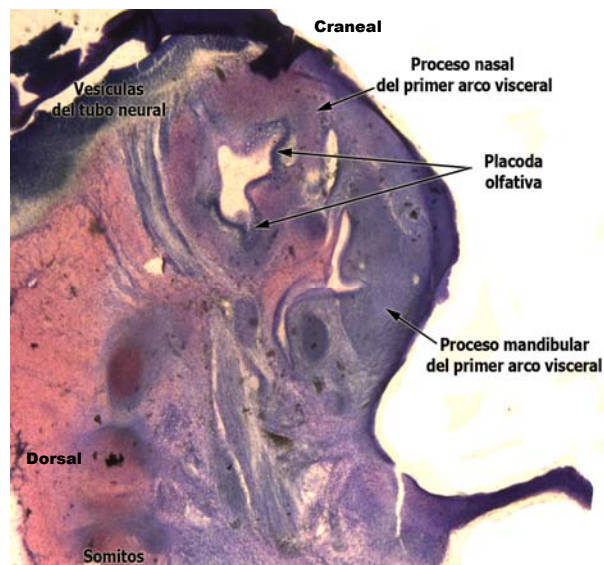
En las secciones obtenidas de embriones y fetos bovinos de distintas edades y procesadas con la técnica de IHQ usando el anticuerpo monoclonal LHR13 se observaron elementos GnRH-ir solamente en algunas categorías etarias. Por otro lado, las secciones provenientes de embriones y fetos de todas las edades estudiadas, procesadas en paralelo con las anteriores, utilizando la misma técnica pero incubadas con el anticuerpo policlonal cII675 para el reconocimiento de cGnRHII fueron inmunonegativas en todos los casos.

Los elementos GnRH-ir detectados con el anticuerpo monoclonal LHR13 corresponden tanto a fibras como a somas celulares presentes en distintas localizaciones de la región cefálica fetal y fueron visibles sólo en determinados períodos del desarrollo (Figura 18). La menor edad

gestacional donde se confirmó la presencia de elementos GnRH-ir fue en fetos de 8 semanas de desarrollo. Las secciones obtenidas de ejemplares de  $\leq 7$  semanas de gestación no tuvieron ningún tipo de estructuras (fibras o somas celulares) inmunopositivas. De la misma forma, no pudieron detectarse elementos GnRH-ir en fetos comprendidos entre las 10-11 semanas de edad. Sin embargo, en fetos de 8 semanas, 12 semanas; 17-18 semanas; 21-22 semanas de gestación las fibras y los somas neuronales fueron evidentes en las regiones nasales o encefálicas de los fetos.



**Figura 18.** Edad del desarrollo expresado en semanas de los embriones y los fetos bovinos en relación con la presencia de elementos inmunorreactivos para el anticuerpo LHR13 (GnRH mamífera) y el cII 675 (GnRH aviar). PPb: animal prepúber.



**Figura 19.** Fotografía de la placoda olfativa de un embrión bovino de aproximadamente 25 días de edad gestacional (40X).

#### **4.2. Las estructuras (somas celulares y fibras) GnRH-ir en fetos bovinos de 8 semanas de gestación**

En todos los fetos (n=5) de esta edad se identificaron elementos GnRH-ir cuando se utilizó el anticuerpo LHR13. Sin embargo, y como se ha mencionado previamente, no se detectaron elementos inmunorreactivos al anticuerpo cII 675.

En esta edad del desarrollo, los fetos tuvieron una cavidad nasal casi totalmente formada con paredes de estructura cartilaginosa. Se observó, en avanzado estado de desarrollo, el cartílago que da origen a las porciones nasales del hueso etmoides (etmoturbinados y lámina perpendicular). En el tercio rostral de la cavidad nasal, próximo al piso y al septo de la nariz se observó el órgano vomeronasal en desarrollo. Esta estructura estaba rodeada de una voluta de cartílago y tapizada por un epitelio que es continuo con el de la cavidad (Figuras 20 a 27). La placoda olfativa no existió como formación anatómica diferenciable, pues las células placodales han migrado y colonizado el epitelio que recubre el fondo de la cavidad nasal (epitelio olfativo) y el que recubre internamente el órgano vomeronasal.

El promedio de somas celulares GnRH-ir estimados en este período del desarrollo fue de  $1885 \pm 226 \mu\text{m}$  con un rango que osciló entre 1554 y 2208  $\mu\text{m}$  (Tabla 10). Las células GnRH-ir se identificaron en distintos sectores de la cabeza de los fetos. El  $55,1 \pm 7\%$  (n=511 $\pm$ 359) de las células GnRHir fueron observadas en el interior de la cavidad nasal. Un  $12,5 \pm 3,6\%$  (n=232 $\pm$ 50) de las células GnRH-ir se ubicó en una banda estrecha de tejido que corresponde a la intersección naso-encefálica, en íntima relación con los nervios vomeronasales y terminal. El restante  $32,4 \pm 23,4\%$  (n=601 $\pm$ 434) de las células GnRH-ir fueron identificadas en distintas regiones del prosencéfalo secundario.

Las proporciones de neuronas halladas en la cavidad nasal, en la intersección naso-encefálica y en el prosencéfalo tuvieron amplias variaciones entre los fetos de esta categoría etaria y no hubo una correlación directa con la edad estimada en días de cada uno de ellos (Tabla 10).

En la cavidad nasal de estos fetos se observaron células GnRH-ir, las que pueden clasificarse como dos tipos morfológicos distintos. Uno de estos tipos fueron células de aspecto redondeado semejantes a neuroblastos, sin prolongaciones citoplasmáticas evidentes y constituyeron el 32,5% de los somas ubicados en el interior de la cavidad nasal. El 67,5% restante de las células GnRH-ir identificadas en diferentes sectores de la cavidad nasal fueron de aspecto fusiforme, semejante a neuronas bipolares con dos prolongaciones largas. Las NGB representaron el  $17,9 \pm 17,4\%$  ( $n=332 \pm 300$ ) y las NGCNa se estimaron en el 37,2% ( $n=690 \pm 347$ ) del total de la población de las células GnRH-ir (Tabla 10).

Las células GnRH-ir que no se encontraron en la cavidad nasal, también pudieron subdividirse en dos grandes grupos con localizaciones diferentes. El primer sector constituyó la zona de unión entre la cavidad nasal y la cavidad craneal del feto (unión naso-encefálica), donde se observó una gran cantidad de somas celulares GnRH-ir de aspecto fusiforme y bipolar. Estas células NGNT en los fetos de 8 semanas de desarrollo representó el 12,5% ( $232 \pm 50$ ) del total de la población de células GnRH-ir (Tabla 10). El segundo sector que alojó somas GnRH-ir correspondió al prosencéfalo secundario, desde la porción que forma el bulbo olfativo hasta el hipotálamo en desarrollo. Las células GnRH-ir ubicadas en estas regiones fueron fusiforme y bipolares y representaron el 32,5% ( $n=601 \pm 434$ ) de la población total. (Tabla 10).

**Tabla 10.** Cantidad y proporción de neuronas GnRH-ir en fetos de 8 semanas discriminados por ubicación y por días de edad gestacional.

Feto	Edad estimada (días)	Cantidad y proporción de neuronas GnRHir estimadas								
		NGB		NGCNa		NGNT		NGE		Total
		n	%	N	%	n	%	n	%	n
<b>202</b>	50	672	33,0	822	40,4	198	9,7	342	16,8	<b>2034</b>
<b>203</b>	51	144	7,9	1092	60,2	180	9,9	396	21,8	<b>1812</b>
<b>205</b>	53	102	6,1	174	10,4	306	18,3	1086	65,1	<b>1668</b>
<b>56</b>	55	96	4,3	816	36,9	252	11,4	1044	47,2	<b>2208</b>
<b>57</b>	56	648	41,6	546	35,1	222	14,2	138	8,8	<b>1554</b>
<b>Media±DS</b>		332±300	17,9±17,4	690±347	37,2±17,8	232±50	12,5±3,6	601±434	32,4±23,4	<b>1855±226</b>

NGB: células GnRH-ir de aspecto neuroblástico; NGNa: células GnRH-ir de aspecto bipolar en la cavidad nasal; NGNT: células GnRH-ir de aspecto bipolar en la intersección naso-encefálica; NGE: células GnRH-ir de aspecto bipolar en el prosencéfalo secundario.

Las células y fibras GnRH-ir identificadas en la cavidad nasal se visualizaron principalmente en los planos sagitales adyacentes al plano medio de la cabeza (Figuras 20-27). Los elementos inmunorreactivos se encontraron próximos al septo nasal y se distribuyeron tanto en su porción dorsal, media y ventral, como en los tercios rostral, medio y caudal de la cavidad nasal.

Las NGB, tanto por la forma, como por la distribución dentro de las regiones nasales, fueron células que no se encontraban en proceso de migración y se observaron en pequeños grupos de 4 a 13 células, o bien en forma aislada, intercaladas en el epitelio que recubre la mucosa de la cavidad nasal y del órgano vomeronasal. La población NGB en fetos de esta edad se ubicó, principalmente, en la zona de unión del tercio rostral y medio de la cavidad, aunque un número importante de este tipo morfológico aparece a distintos niveles del tercio medio de la mucosa que tapiza el tabique nasal (Figuras 20-27).

Las células NGB fueron abundantes en la mucosa del órgano vomeronasal, donde se observaron en pequeños grupos de 3 a 4 células, otras veces se visualizaron como células aisladas ubicadas principalmente en las porciones media y caudal. Una pequeña cantidad

(menos del 5%) de NGB fue hallada en la parte más caudal del tercio medio del epitelio de la cavidad nasal (Figuras 20-27).

Las neuronas NGCNa de la cavidad nasal se encontraron en pequeños grupos de 3 a 7 células o bien como células aisladas. Este tipo celular en su conjunto estaría en pleno proceso de migración por la mucosa que cubre el septo de la nariz. Tanto las fibras como los somas GnRH-ir fueron observados siguiendo un trayecto predeterminado sobre los nervios vomeronasales y en forma paralela a los vasos sanguíneos. Considerando la ubicación y orientación de los somas NGCNa y sus fibras, así como la relación que establecen con los nervios en el interior de la cavidad nasal se pudieron distinguir tres rutas principales de migración.

En su conjunto, estas rutas migratorias (Figura 27) fueron semejantes a un triángulo rectángulo con la base o cateto menor en la parte rostral de la cavidad nasal, el cateto mayor paralelo y cercano al techo de la cavidad y el vértice en la intersección naso-encefálica (parte dorsal de la futura lámina cribada del hueso etmoides). Las neuronas GnRH-ir bipolares que denominamos NGCNa migraron por rutas definidas siguiendo los nervios, atravesando la lámina cribada del hueso etmoides en dirección caudo-dorsal, para finalmente reunirse en un solo grupo sobre el nervio terminal. De esta forma, las células GnRH-ir ingresan en la cavidad craneal y continúan su migración atravesando la parte más rostral del prosencéfalo secundario (bulbo olfatorio) (Figuras 20-30).

A las 8 semanas del desarrollo, las regiones donde se ubicaron las células tipo NGB representó el sector más rostral con presencia de elementos GnRH-ir, por lo tanto, este fue el punto de inicio de las rutas migratorias observadas. A partir de aquí, las neuronas y fibras GnRH-ir conformaron tres vías de migración con diferente densidad de elementos inmunorreactivos.



La ruta más poblada por somas y fibras GnRH-ir representó el lado ventral (hipotenusa) del triángulo y tuvo como punto de origen el órgano vomeronasal. Las células NGCNa estaban alineadas sobre los filetes ventrales del nervio vomeronasal, orientadas en sentido caudo-dorsal y en proximidad a los vasos sanguíneos que acompañaban estos filetes nerviosos. Estas células GnRH-ir se extendieron a lo largo de la cavidad nasal hasta la intersección naso-encefálica (Figuras 20 a 30).

Por otro lado, el interior del triángulo era atravesado por varios filetes del nervio vomeronasal también acompañados de vasos sanguíneos. Sobre cada una de estas ramas (4 o 5) se ubicaron células NGCNa en aparente estado de migración que iban confluyendo en dirección caudo-dorsal (Figuras 20 a 27). Finalmente, el lado dorsal (cateto mayor) del triángulo se encontró inmediatamente ventral al cornete nasal dorsal (hueso etmoturbinado I) en desarrollo, en la parte dorsal del futuro meato nasal medio. Las fibras y neuronas GnRH-ir se alinearon sobre el nervio terminal y se dirigieron caudalmente para alcanzar la intersección naso-encefálica. Las células GnRH-ir que migran por esta ruta partieron de la región dorsal y media del epitelio nasal que cubre la zona de unión del tercio rostral y medio de la cavidad (Figuras 20 a 28). Al igual que en las rutas descritas previamente se observaron filetes nerviosos y vasos sanguíneos adyacentes sobre los cuales se alinean las neuronas NGCNa y sus fibras.

En síntesis, la distribución de los somas y fibras GnRH-ir del tipo celular NGCNa se encontró íntimamente asociada a las ramas del nervio vomeronasal, nervio terminal y a los vasos sanguíneos que acompañaban estos nervios ubicados en el corion de la mucosa que cubre el tabique de la nariz.

En las adyacencias a la intersección naso-encefálica se visualizaron las NGNT (Figura 29) que aparecieron como una red de somas bipolares y fibras GnRH-ir. A ambos lados del plano mediano, muy próximo a la zona más dorsal del embrión e inmediatamente debajo del hueso

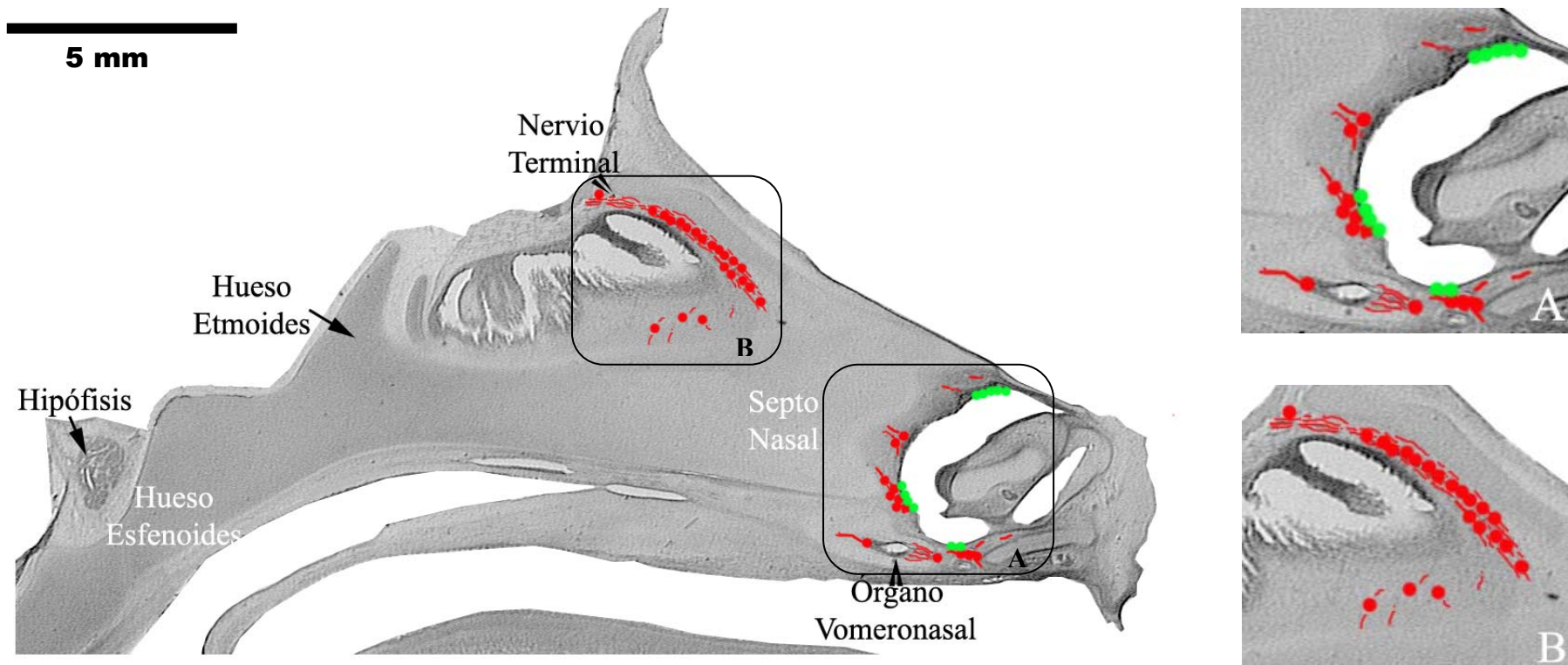
frontal en desarrollo se observaron las NGNT y sus fibras realizando el pasaje desde la cavidad nasal hacia la cavidad craneal (Figura 29). Esta fue la misma zona anatómica por donde los nervios vomeronasales y el nervio terminal penetraron en la cavidad craneal en formación.

Las fibras y neuronas GnRH-ir en su trayecto hacia la intersección naso-encefálica describieron un corto trayecto descendente en dirección caudo-ventral y abandonaron la cavidad nasal atravesando el hueso etmoides por el meato nasal dorsal (Figuras 21, 22 y 25).

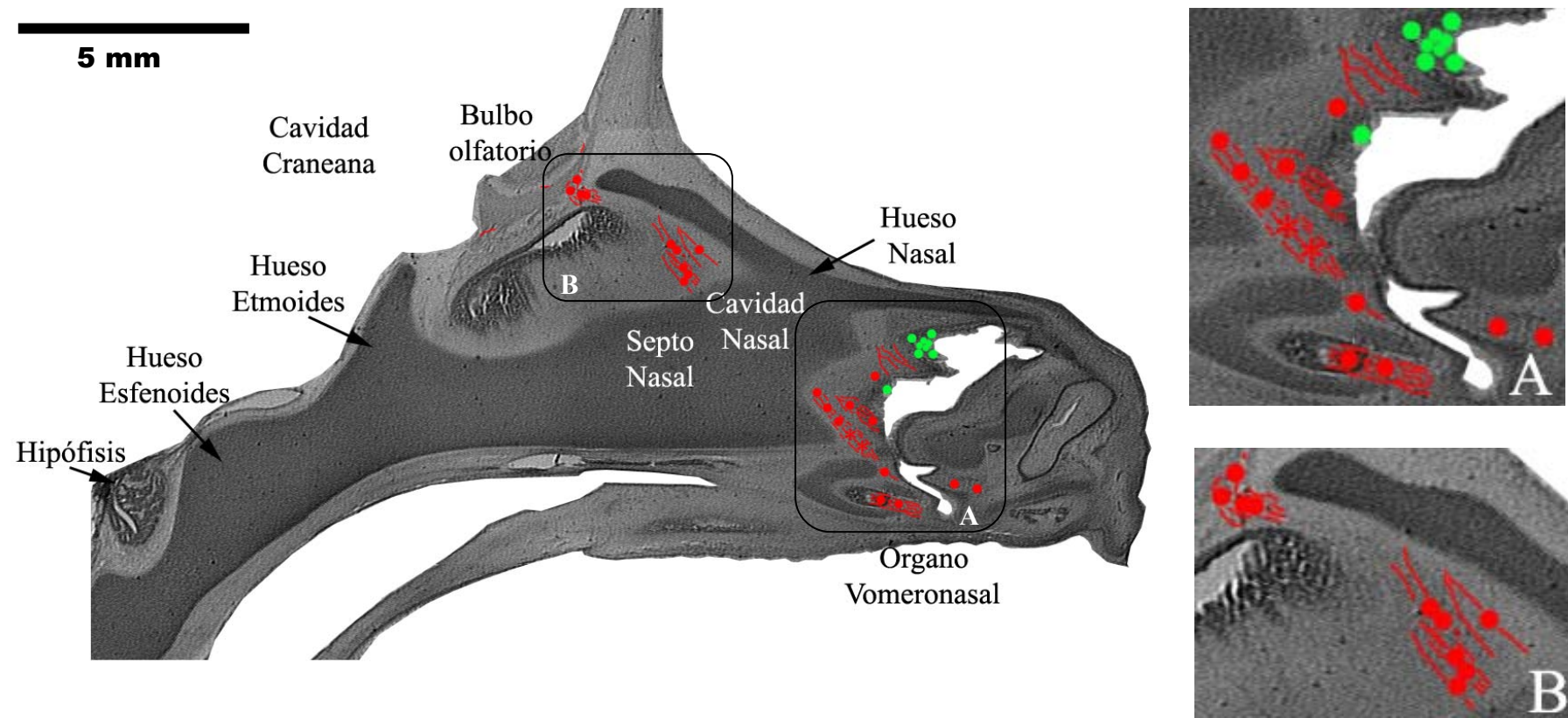
En este punto los elementos GnRH-ir se encontraron en la porción más rostral del prosencéfalo secundario que está formando el bulbo olfatorio del cerebro.

Inmediatamente a su ingreso en el tejido nervioso a las células GnRH-ir las identificamos como NGE y se observó un doble cambio de dirección migratoria. Los somas NGE y sus fibras primero cambiaron de dirección para dirigirse hacia dorso-craneal y luego retomaron la ruta con dirección caudal. De manera que en el interior del bulbo olfatorio las neuronas y fibras GnRH-ir realizaban un trayecto en “U” horizontal abierta hacia ventral y cauda (Figuras 27 y 28).

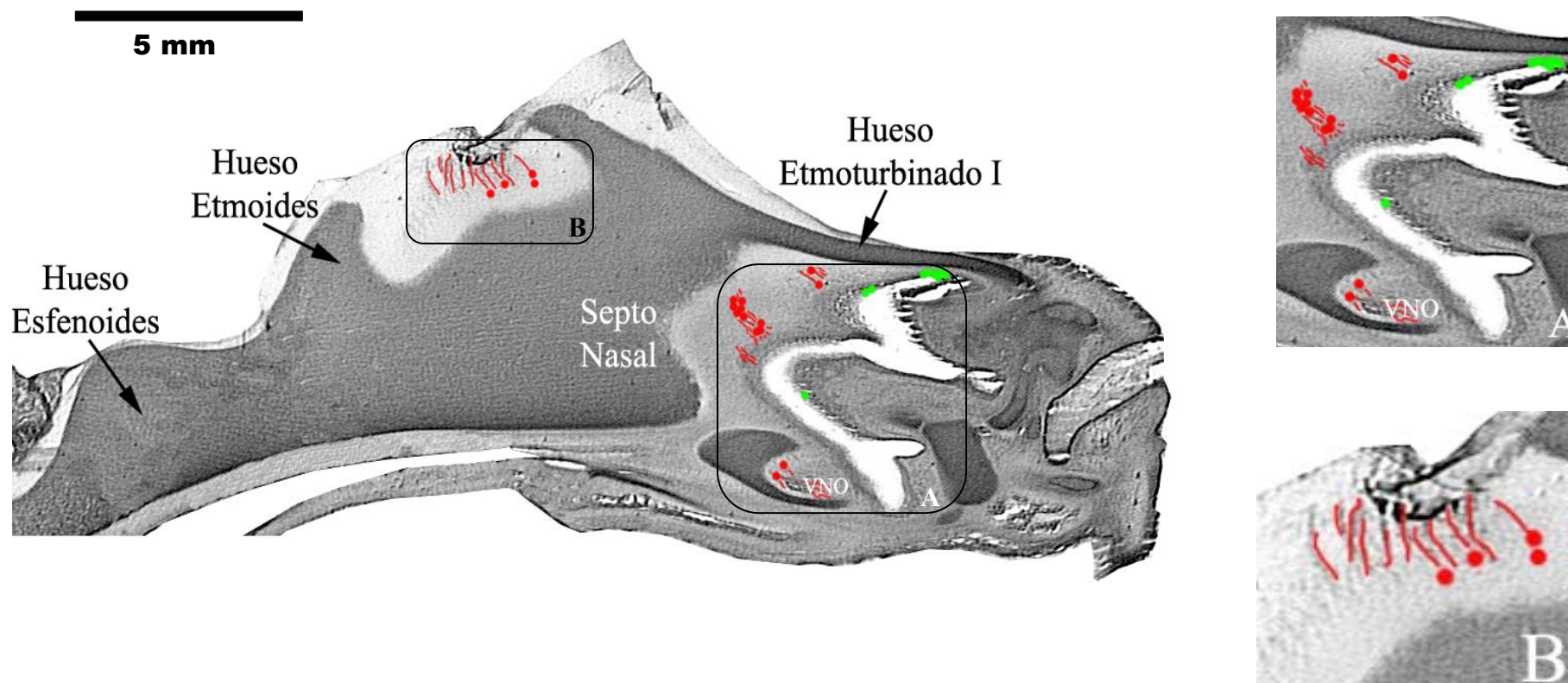
A partir de aquí, las NGE prosiguieron su migración sobre el nervio terminal, de manera que se dirigieron hacia dorso-caudal para posteriormente descender, describiendo una “V” invertida, alcanzando de esta forma, la zona media y ventral del hipotálamo, en el territorio presuntivo del área septo-preóptica (Figura 28).



**Figura 20.** Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, en el plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático). Se grafican los dos extremos de la ubicación de los elementos GnRH-ir (cada círculo indica un soma celular, NGB: círculos verdes; NGCNA: círculos rojos; fibras GnRH-ir: líneas rojas). A) Representación de las NGB GnRH-ir en pequeños grupos en el epitelio nasal en el tercio rostral de la cavidad nasal, donde también es evidente el órgano vomeronasal con abundantes fibras y neuronas GNRH-ir. B) Aproximadamente 22 somas GnRH-ir, aislados o formando grupos y abundantes fibras GnRH-ir se observan migrando en dirección caudo-dorsal dentro de la mucosa nasal. Estos elementos GnRH-ir aparecen sobre los nervios vomeronasales y el nervio terminal.

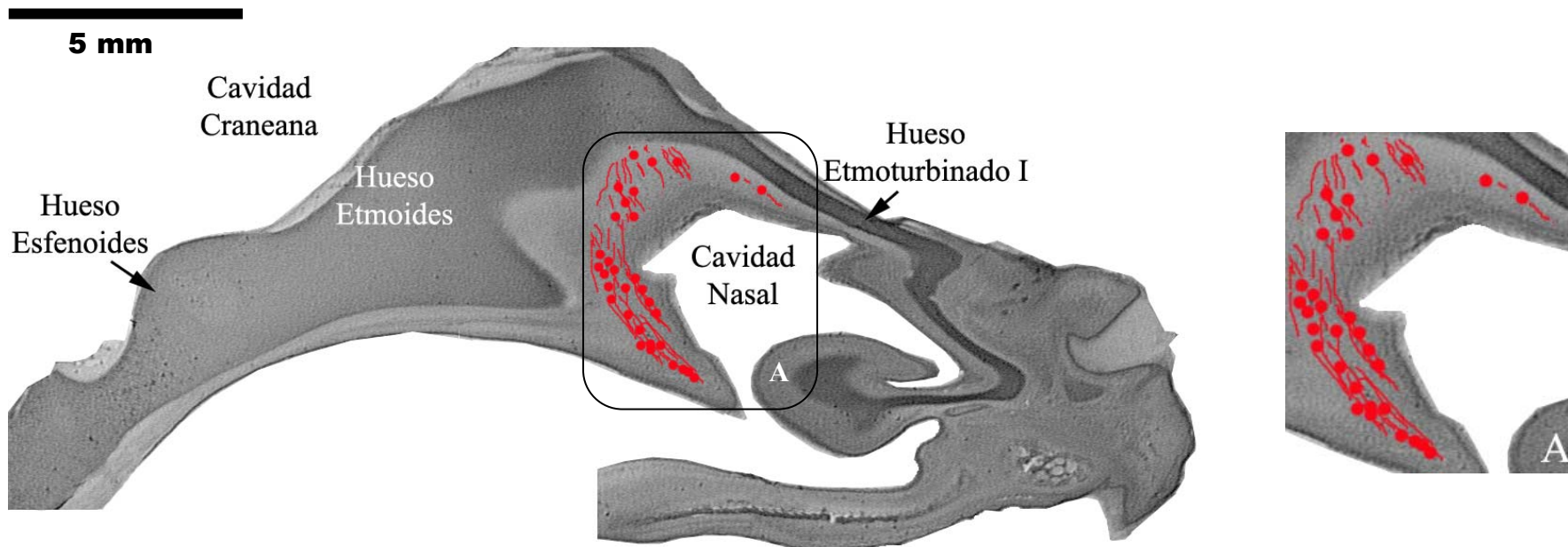


**Figura 21.** Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 150  $\mu$ m del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático). Se grafican los dos extremos de la ubicación de los elementos GnRH-ir (cada círculo indica un soma celular, NGB: círculos verdes; NGCNa: círculos rojos; fibras GnRH-ir: líneas rojas). A) Escasos NGB aislados o agrupados aparecen en el epitelio nasal. En el órgano vomeronasal y sobre él se observa la presencia de abundantes fibras y NGCNa que indican la migración en dirección cuado-dorsal en forma alineada con los filetes del nervio vomeronasal. B) Se observan seis somas tipo NGCNa rodeados de fibras GnRH-ir en la parte más caudal y dorsal de la mucosa nasal. Mientras que en la intersección naso-encefálica se observa la presencia de cuatro somas NGCNa y fibras GnRH-ir sobre el curso del nervio terminal.

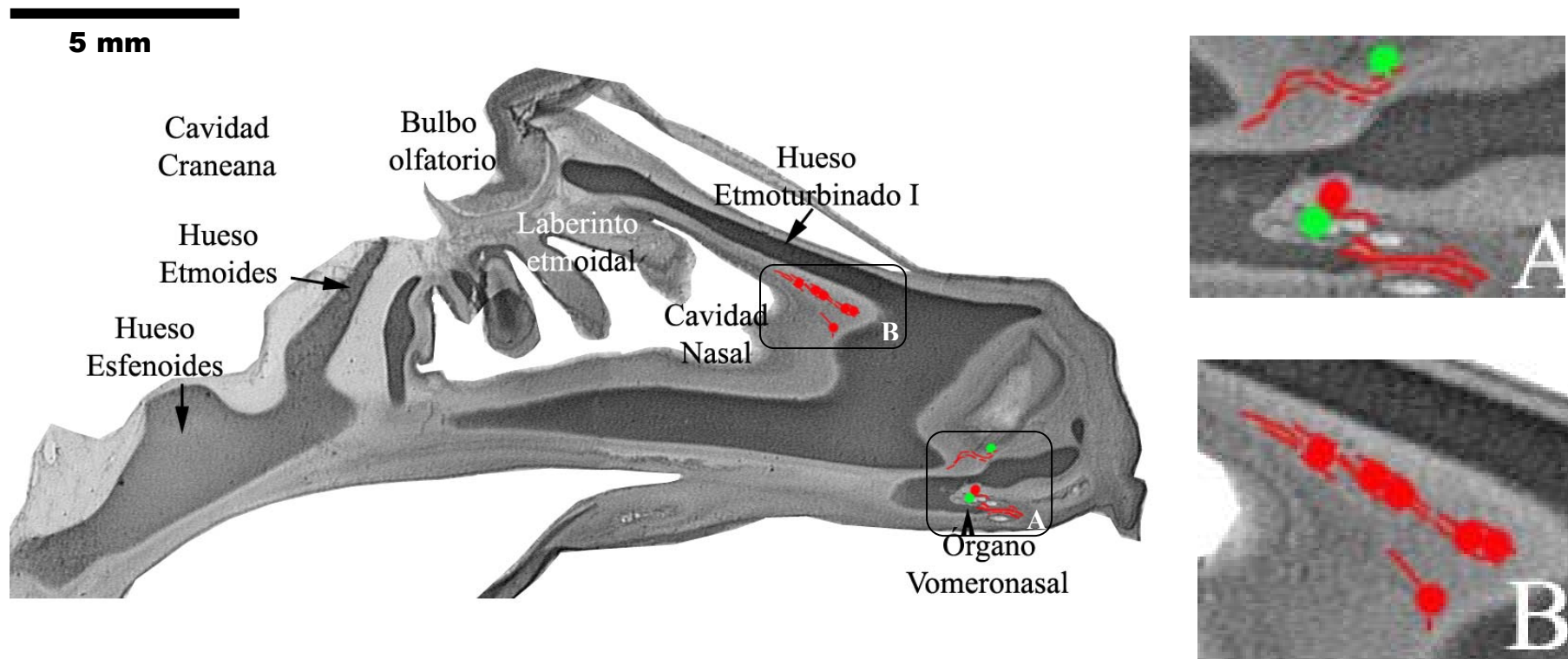


**Figura 22.** Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 250  $\mu\text{m}$  del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático). Se grafican los dos extremos de la ubicación de los elementos GnRH-ir (cada círculo indica un soma celular, NGB: círculos verdes; NGCNa: círculos rojos; fibras GnRH-ir: líneas rojas). A) En la unión del tercio rostral y medio de la cavidad nasal aparecen algunas células NGB ubicadas en el epitelio nasal de la porción dorsal. Las células NGCNa se localizan sobre los nervios vomeronasal y terminal rodeadas por fibras GnRH-ir en dirección caudo-dorsal. En el órgano vomeronasal (VNO) se observan escasas células NGCNa con un paquete de fibras. B) Los elementos GnRH-ir aparecen en la parte más caudo-dorsal de la cavidad muy cercanos a la lámina cribada del etmoides.

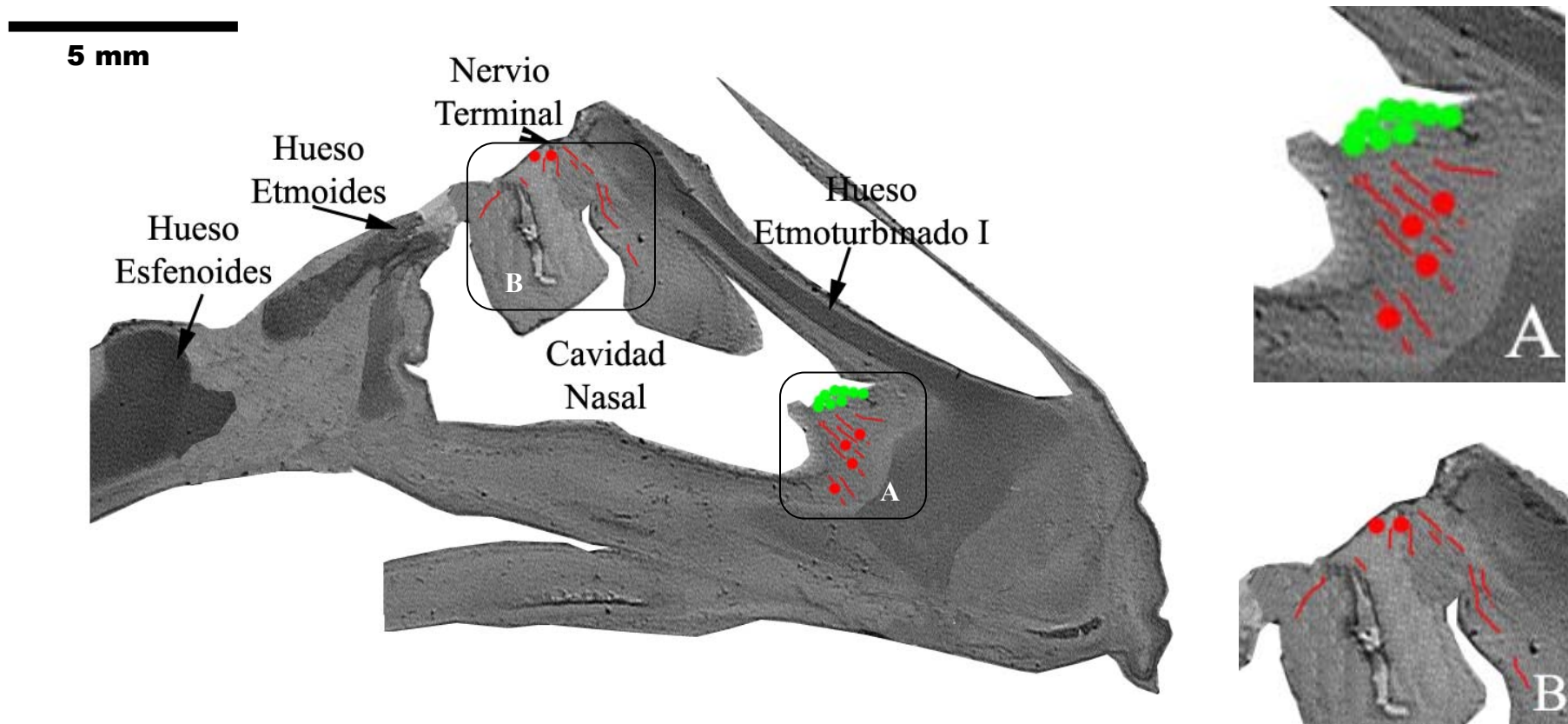




**Figura 23.** Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 300  $\mu\text{m}$  del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático). Se grafican los dos extremos de la ubicación de los elementos GnRH-ir (cada círculo indica un soma celular, NGB: círculos verdes; NGCNa: círculos rojos; fibras GnRH-ir: líneas rojas). A) Se observan abundantes fibras y somas GnRH-ir tipo NGCNa ( $n=32$ ) aislados o formando grupos. La ubicación y el eje mayor de estas células sugiere que se encuentran en pleno proceso de migración sobre filetes nerviosos y vasos sanguíneos. Los elementos GnRH-ir ubicados más caudo-dorsales se encuentran próximos a la superficie nasal del hueso etmoides.

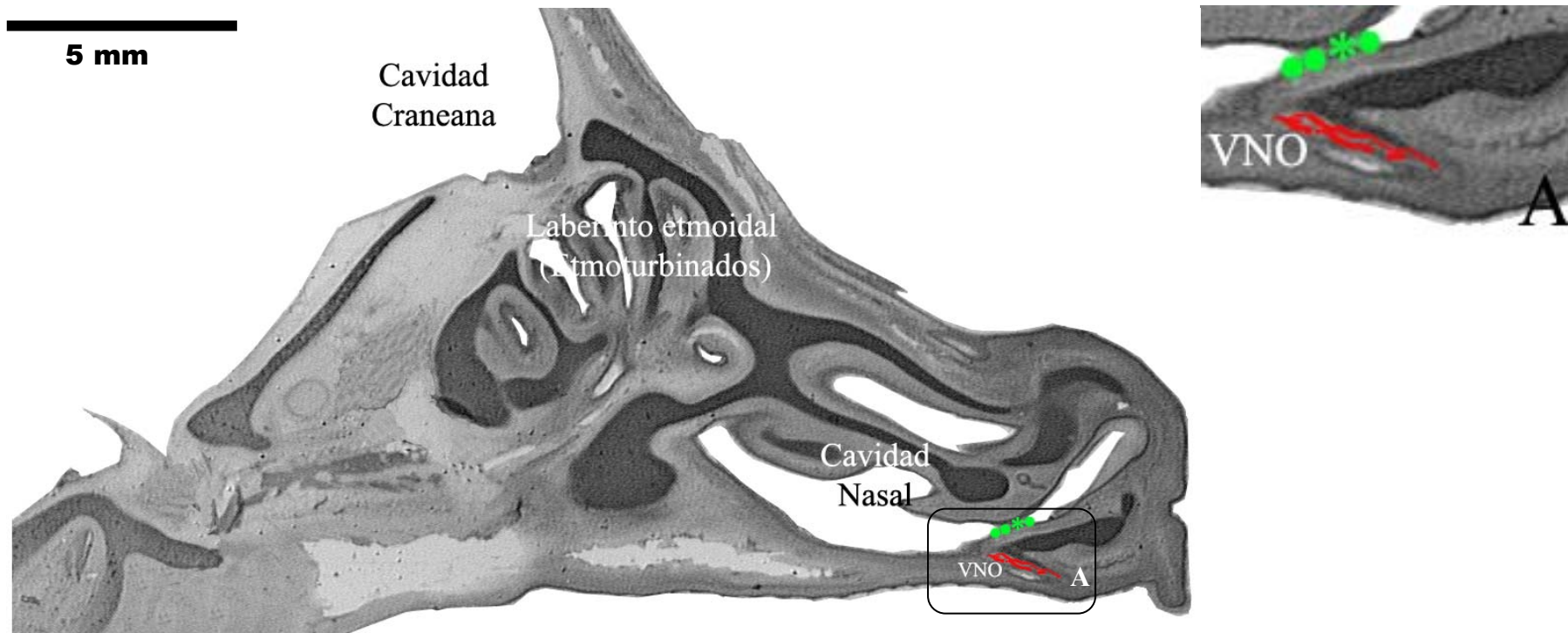


**Figura 24.** Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 450  $\mu\text{m}$  del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático). Se grafican los dos extremos de la ubicación de los elementos GnRH-ir (cada círculo indica un soma celular, NGB: círculos verdes; NGCNa: círculos rojos; fibras GnRH-ir: líneas rojas). A) Sólo dos somas NGB aparecen en el epitelio nasal y en el órgano vomeronasal. Las fibras y somas NGCNa son abundantes en los mismos sectores del epitelio nasal. B) Fibras y somas NGCNa alineados en dirección caudo-dorsal sobre una ruta definida, inmediatamente ventral y paralela al hueso etmoturbinado I, sobre las fibras del nervio teminal.

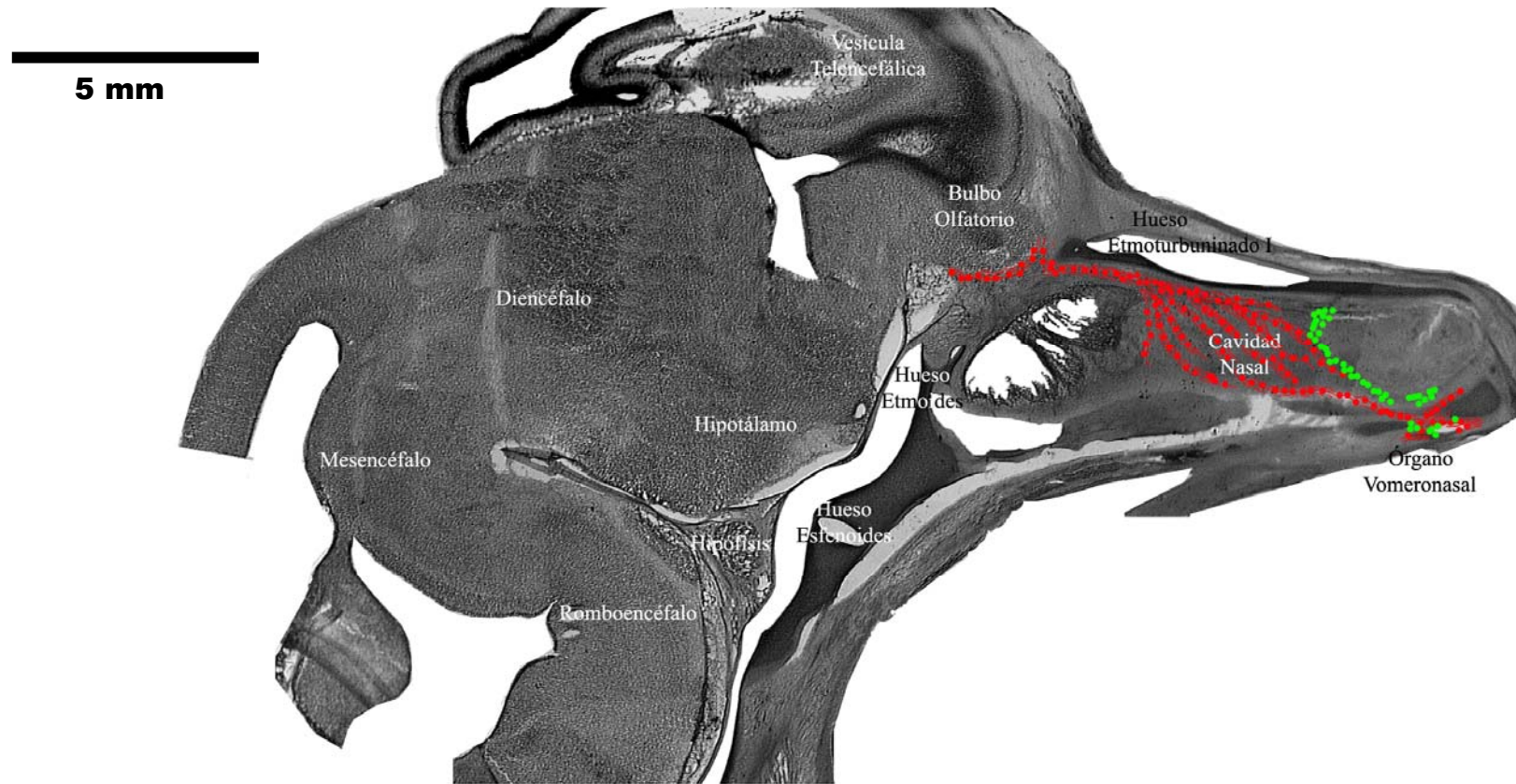


**Figura 25.** Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 500  $\mu$ m del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático). Se grafican los dos extremos de la ubicación de los elementos GnRH-ir (cada círculo indica un soma celular, NGB: círculos verdes; NGCNa: círculos rojos; fibras GnRH-ir: líneas rojas). A) Numerosos somas NGB aparecen en el epitelio nasal y por debajo de ellos se identifican fibras y somas NGCNa alineados hacia caudo-dorsal. B) Fibras y escasos somas NGCNa alineados en dirección caudo-dorsal en la proximidad del nervio terminal.

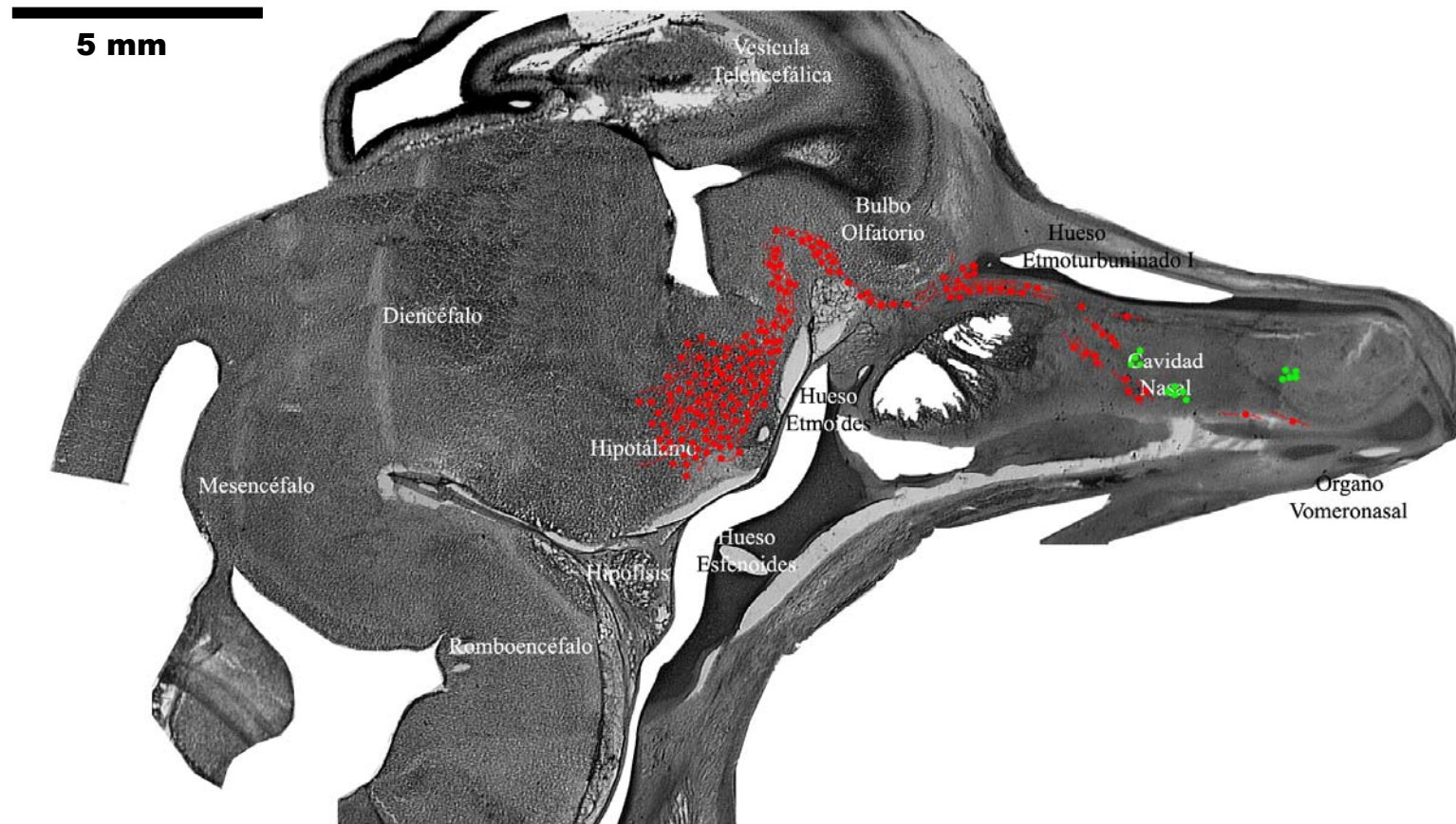




**Figura 26.** Reconstrucción a partir de microfotografías (12.5 X) de una sección sagital completa de la cavidad nasal, 600  $\mu\text{m}$  del plano mediano de un feto de 8 semanas de desarrollo (semiesquemático). Se grafican los dos extremos de la ubicación de los elementos GnRH-ir (cada círculo indica un soma celular y el asterisco 4 somas agrupados, NGB: círculos verdes; NGCNa: círculos rojos; fibras GnRH-ir: líneas rojas). A) Solamente en la vecindad del órgano vomeronasal (VNO) se observan elementos GnRH-ir. Algunos somas NGB (7) agrupados aparecen en posición dorsal al VNO, mientras que en su interior se visualizan numerosas fibras GnRH-ir dirigidas hacia caudo-dorsal.

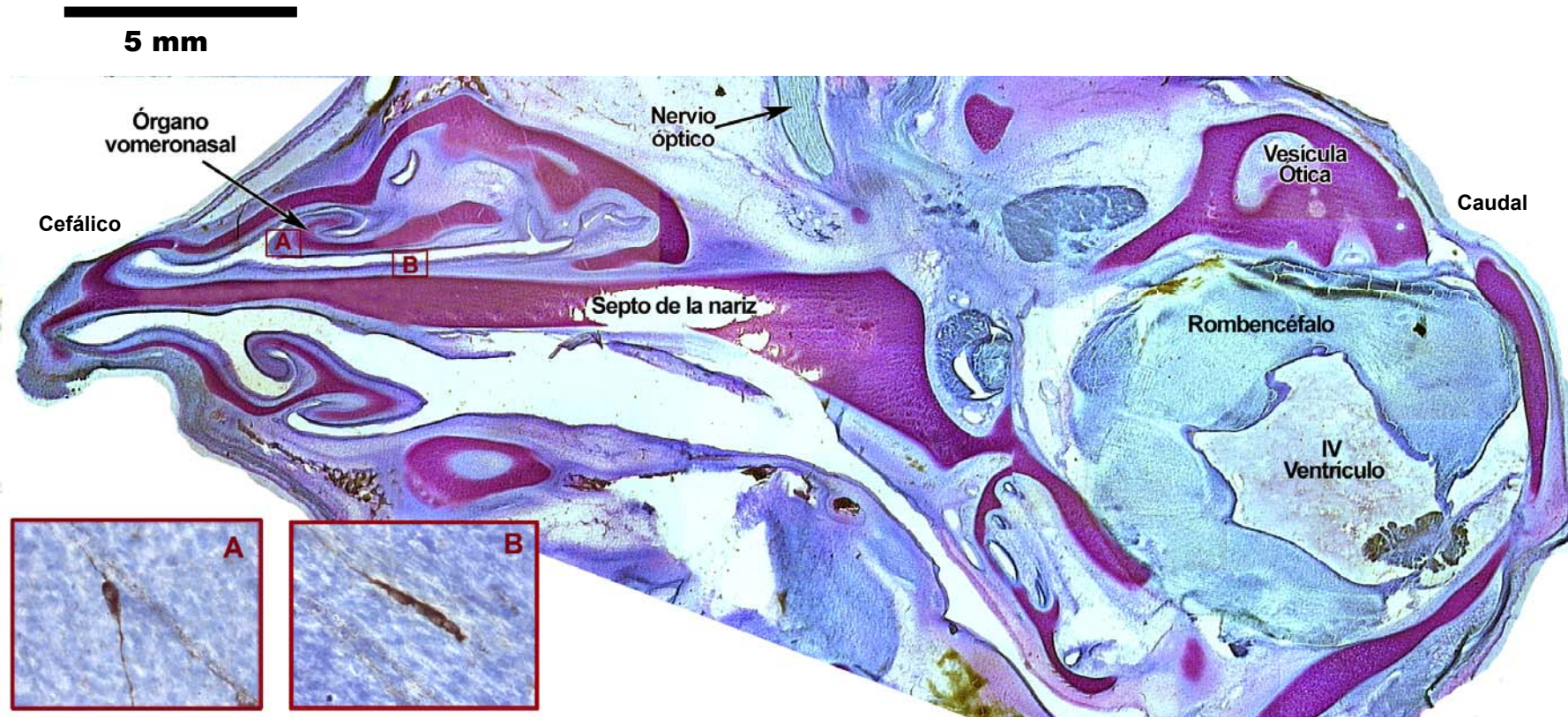


**Figura 27.** Reconstrucción semiesquemática de una sección sagital de la cabeza de un feto de 8 semanas de desarrollo. A partir de varias secciones se ha indicado la ubicación y rutas migratorias de las células NGCNa (círculos rojos) y la localización de las células NGB (círculos verdes). Nótese la notable semejanza entre las rutas de migración con la dirección y distribución de los filetes del nervio vomeronasal. De la misma forma, puede notarse la reunión de las rutas en las fibras del nervio terminal.

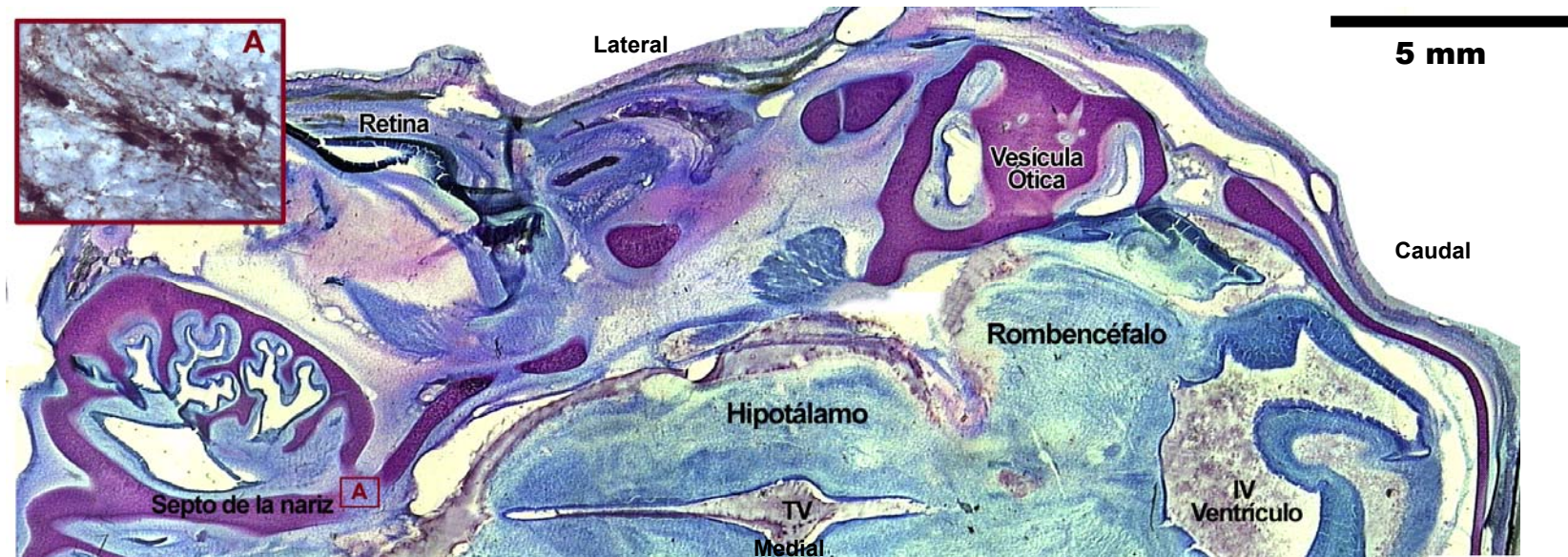


**Figura 28.** Reconstrucción semiesquemática de una sección sagital de la cabeza de un feto de 8 semanas de desarrollo (feto 205). A partir de varias secciones se ha indicado la ubicación y rutas migratorias de las células GnRHir (círculos rojos) y la localización de las células NGB (círculos verdes). Nótese la ruta migratoria encefálica y la notable distribución de las neuronas GnRHir en el prosencéfalo.





**Figura 29.** Sección horizontal de la cabeza de un feto de 8 semanas de desarrollo. Se observan las estructuras cartilaginosas que forman parte del tercio ventral de la cavidad nasal fetal y el rombencéfalo. En el recuadro A se presenta una mayor magnificación (400 X) de la mucosa que recubre el órgano vomeronasal, donde se aprecia la presencia de una neurona GnRH-ir de tipo bipolar. En el recuadro B se observa un grupo de neuronas GnRH-ir (400 X) alineadas sobre una ruta de migración en el interior de la mucosa que tapiza el septo de la nariz.



**Figura 30.** Sección horizontal de la cabeza de un feto de 8 semanas de desarrollo. Se observan las estructuras cartilaginosas que forman parte del tercio dorsal de la cavidad nasal fetal y los derivados del prosencéfalo secundario (hipotálamo), así como la vesícula rombencefálica. En el recuadro A se presenta una mayor magnificación (400 X) de la intersección naso-encefálica donde se observa la presencia de varias neuronas de tipo bipolar y numerosas fibras GnRH-ir.

#### **4.3. Distribución de neuronas y fibras GnRH-ir en fetos bovinos de 12 semanas de desarrollo.**

Los cortes coronales de los fetos bovinos de 12 semanas de desarrollo mostraron un hipotálamo y tálamo ventral en un avanzado estado de desarrollo. Fue posible identificar los distintos núcleos y áreas hipotalámicas que se observan en un animal que ha completado su ontogenia. Las zonas vecinas (núcleos del cuerpo estriado y complejo nuclear del tálamo) también se encontraron perfectamente delineados, de manera que es posible ubicar los elementos GnRH-ir en zonas definidas del hipotálamo (Figuras 32 y 33).

En los fetos bovinos de 12 semanas de edad gestacional no se encontraron cuerpos celulares GnRH-ir en ningún sector de la cavidad nasal, en la intersección naso-encefálica o en los bulbos olfativos del cerebro. Sin embargo, en el hipotálamo se contabilizaron  $2187 \pm 289$  neuronas GnRH-ir localizadas principalmente en los núcleos de la región rostral. Los somas celulares GnRH-ir se observaron en forma aislada o formando pequeños grupos que ocupaban algunos de los núcleos y áreas hipotalámicas (Figuras 32 y 33). En el área septal, en el área preóptica, en el área hipotalámica anterior y en el núcleo supraóptico se encontraron la mayor proporción (85,49%) de los cuerpos neuronales GnRH-ir. En su mayoría estas neuronas tuvieron dos prolongaciones (bipolares) orientadas paralelas al eje rostral-caudal del hipotálamo. Sin embargo, en todos los fetos de esta categoría etaria, la mayor concentración de neuronas GnRH-ir hipotalámicas se distribuyó difusamente en toda la extensión del área preóptica (POA: 32,55%) en las cercanías del órgano vasculoso de la lámina terminal (Figuras 32 G). En una estrecha banda de tejido ubicada ventral al área preóptica e inmediatamente dorsal al núcleo supraóptico se observó un 16,7% de los somas GnRH-ir, por lo que el área del área preóptica y adyacencias tuvo el 49,25% de los somas GnRH-ir. Desde esta región, el



número de neuronas GnRH-ir se extendió y disminuyó progresivamente tanto hacia rostral como hacia caudal dentro del hipotálamo.

Los somas neuronales del sistema GnRH localizados hacia las regiones rostrales, por delante del área preóptica, representaron el 16,51% de la población total y se ubicaron principalmente en las áreas septales (12,19%) y en el limbo horizontal y vertical de la banda diagonal de Broca (4,32%). Existieron también algunos somas neuronales GnRH-ir en el trayecto de fascículos de fibras nerviosas, tal es el caso de las neuronas observadas en la parte medial de la cápsula interna (0,87%) que fueron consideradas como extrahipotalámicas (Figuras 31 y 32).

Por otro lado, los somas neuronales del sistema GnRH localizados en las regiones ubicadas caudal al área preóptica representaron el 29,45% de los somas GnRH-ir. Estas neuronas se observaron en distintos sectores del hipotálamo mediobasal y se dispusieron preferentemente próximas al piso del hipotálamo. Los cuerpos neuronales GnRH-ir se distribuyeron en toda el área hipotalámica anterior (9,81%), en la parte dorsal del núcleo supraóptico (9,92%) y en el núcleo arcuato y zona periarcuata (0,70%). Sin embargo, un área de alta concentración de somas GnRH-ir caudales al área preóptica no apareció dentro de un área o núcleo definido, sino en una zona triangular con baja densidad celular que quedó comprendida entre el tercer ventrículo y el núcleo arcuato en la parte medial, el área hipotalámica anterior formó el borde dorsal, mientras que el núcleo supraóptico junto con el tracto óptico formaron el contorno ventro-lateral del triángulo (Figura 33 I y J). Esta zona que se coloreó muy tenuemente, tenía el vértice que se proyectó hacia la eminencia media y contuvo el 9,02% de los somas GnRH-ir restantes. En este sector las neuronas también fueron de aspecto bipolar pero tenían una orientación diferente, ya que sus prolongaciones estaban alineadas con una dirección dorso-medial.

Finalmente, el 4,73% de las neuronas GnRH-ir se localizaron en áreas extrahipotalámicas, tales como: la parte medial del núcleo acumbente (1,99%), la parte medial del núcleo caudado (0,04%), la parte dorsal del tubérculo olfativo (0,91%) y otras áreas (0,87%).

La mayor concentración de fibras GnRH-ir se observó también en el área preóptica y el área hipotalámica anterior. Las fibras se proyectaron principalmente hacia la eminencia media y el órgano vasculoso de la lámina terminal. Sin embargo, fueron evidentes numerosas fibras que terminaron en contacto con el epéndimo que tapiza las paredes del tercer ventrículo.

En la zona dorsal del hipotálamo se observaron fibras GnRH-ir sobre el recorrido de la estría terminal y en los núcleos ventrales del tálamo. También, fueron abundantes a ambos lados de los pilares del fornix y de la comisura anterior, así como próximas al plano mediano en el área septal.

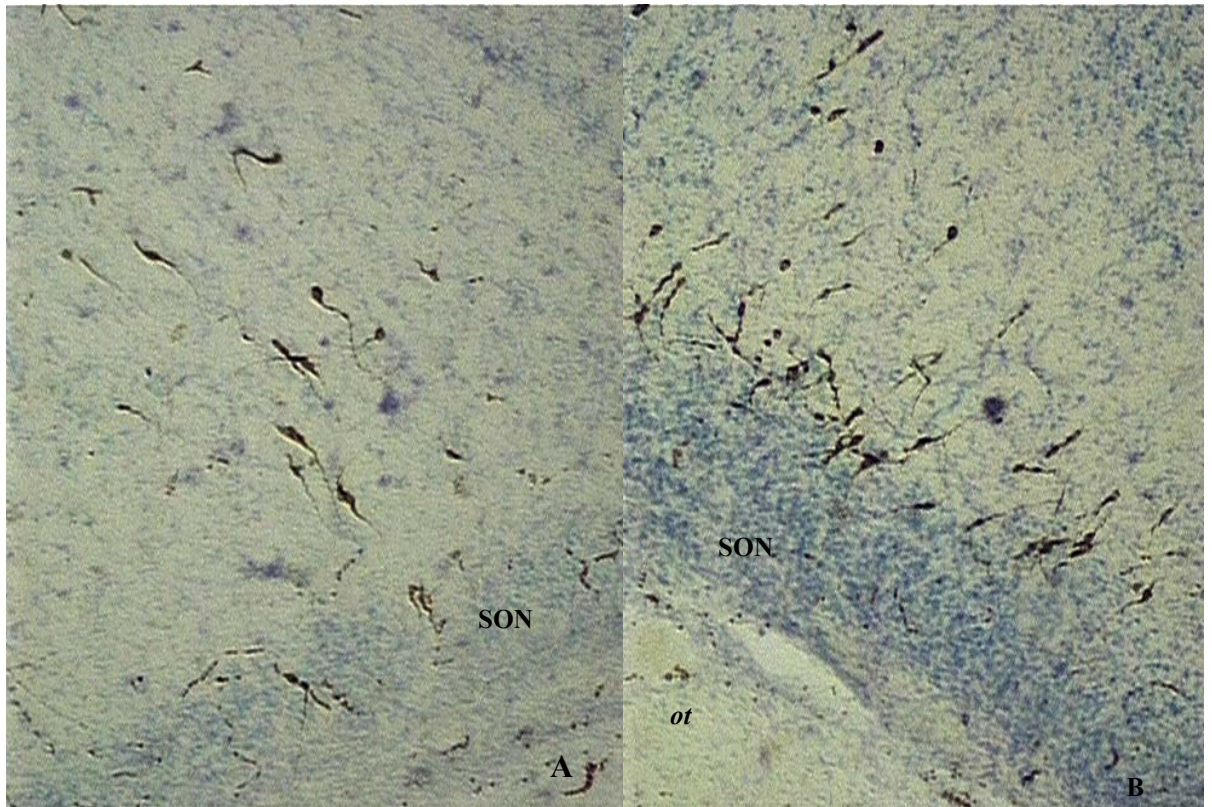
Las fibras GnRH-ir observadas en el interior del área preóptica y del área hipotalámica anterior se organizaron en tractos que ocuparon la parte medial del fascículo basal del prosencéfalo. En estos núcleos se diferenciaron dos grupos de fibras GnRH-ir con recorridos distintos: uno situado en la región ventro-lateral del hipotálamo que se dirigió hacia el órgano vasculoso de la lámina terminal y la eminencia media; y un segundo grupo que recorrió el hipotálamo por la zona periventricular del tercer ventrículo (Figura 33 G y H).

Las fibras del fascículo GnRH-ir ventro-lateral se situaron principalmente en dorsal del núcleo supraóptico y del tracto óptico e inmediatamente laterales al quiasma óptico. En el recorrido por el hipotálamo mediobasal se identificaron como un grupo de fibras que pasaron ventral del VMH para alcanzar la EM (Figura 33 G, H e I).

El segundo tracto de fibras GnRH-ir ubicado en la zona periventricular del tercer ventrículo estaba formado por fibras GnRH-ir más espaciadas y que cursaron próximo al epéndimo que tapiza el ventrículo. Las fibras atravesaron sucesivamente el área medial preóptica, el núcleo



hipotalámico periventricular y el área hipotalámica anterior para finalizar como una proyección hacia ventro-lateral que también se dirigió hacia la eminencia media. Numerosas fibras de este tracto finalizaron en contacto con los endimocitos a todo lo largo del recorrido por el hipotálamo mediobasal (Figura 33 H, I y J).



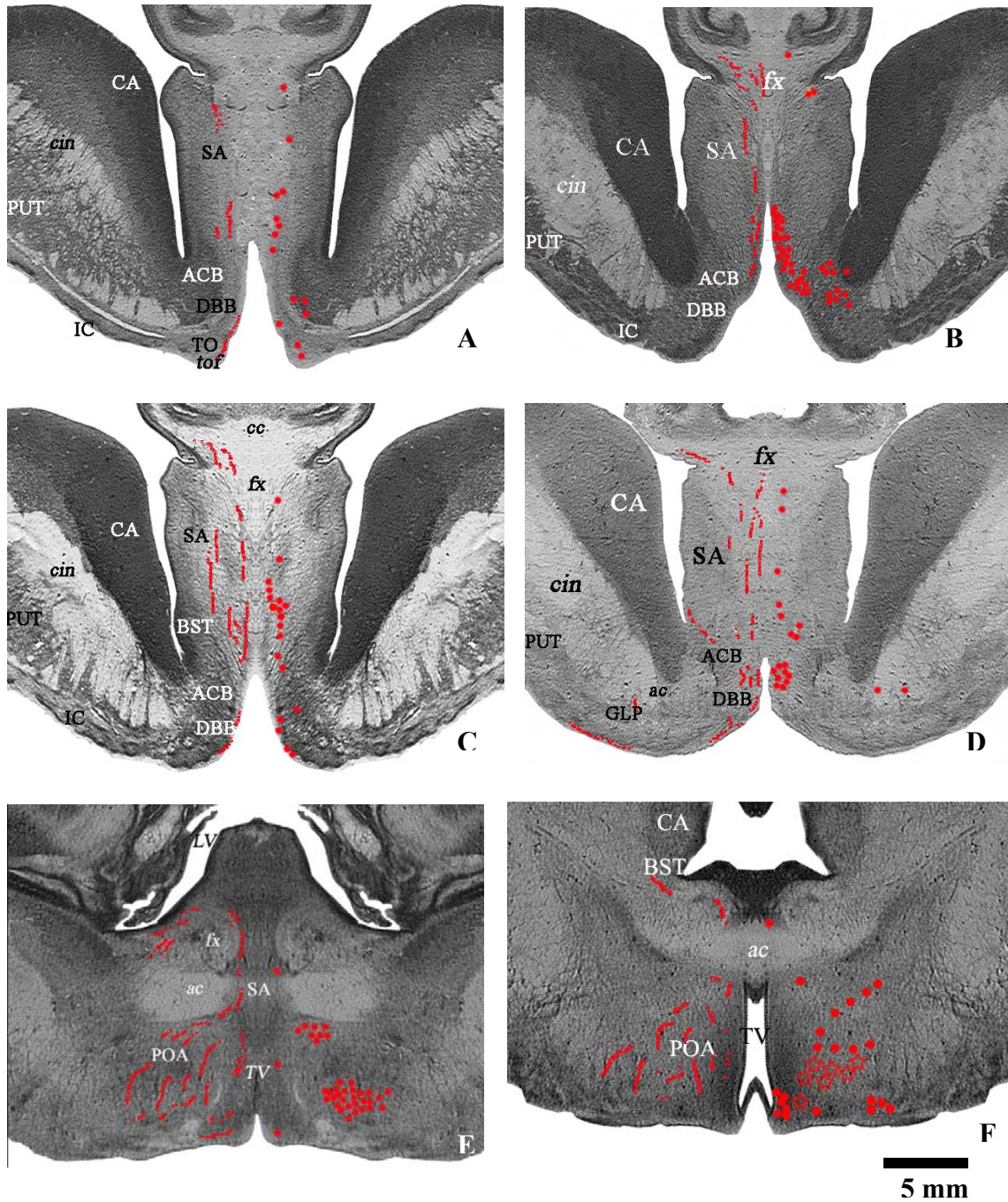
**Figura 31.** Neuronas (A) y fibras (B) GNRHir en área hipotalámica de baja densidad celular con disposición oblicua a perpendicular con respecto al núcleo supraóptico (SON) (100X)

Por otro lado, también se identificaron fibras GnRH-ir que tenían una dirección prácticamente perpendicular al fascículo ventro-lateral. Estas fibras se visualizaron en el triángulo con baja densidad celular citado previamente y ocupado por numerosas neuronas GnRH-ir. Estas fibras se proyectaron hacia el área hipotalámica anterior, partiendo de las neuronas GnRH-ir que tenían esa misma orientación (Figura 31 A y B y 33 H y J).

Se han identificado numerosas fibras GnRH-ir en otras localizaciones. Los pilares del fornix y, en menor medida, la comisura anterior ubicados desde el hipotálamo rostral hasta el hipotálamo medio estaban rodeados por fibras GnRH-ir (Figura 31 C, D y E). Estas fibras, en general, tenían una dirección descendente hacia los núcleos y áreas más ventrales del hipotálamo.

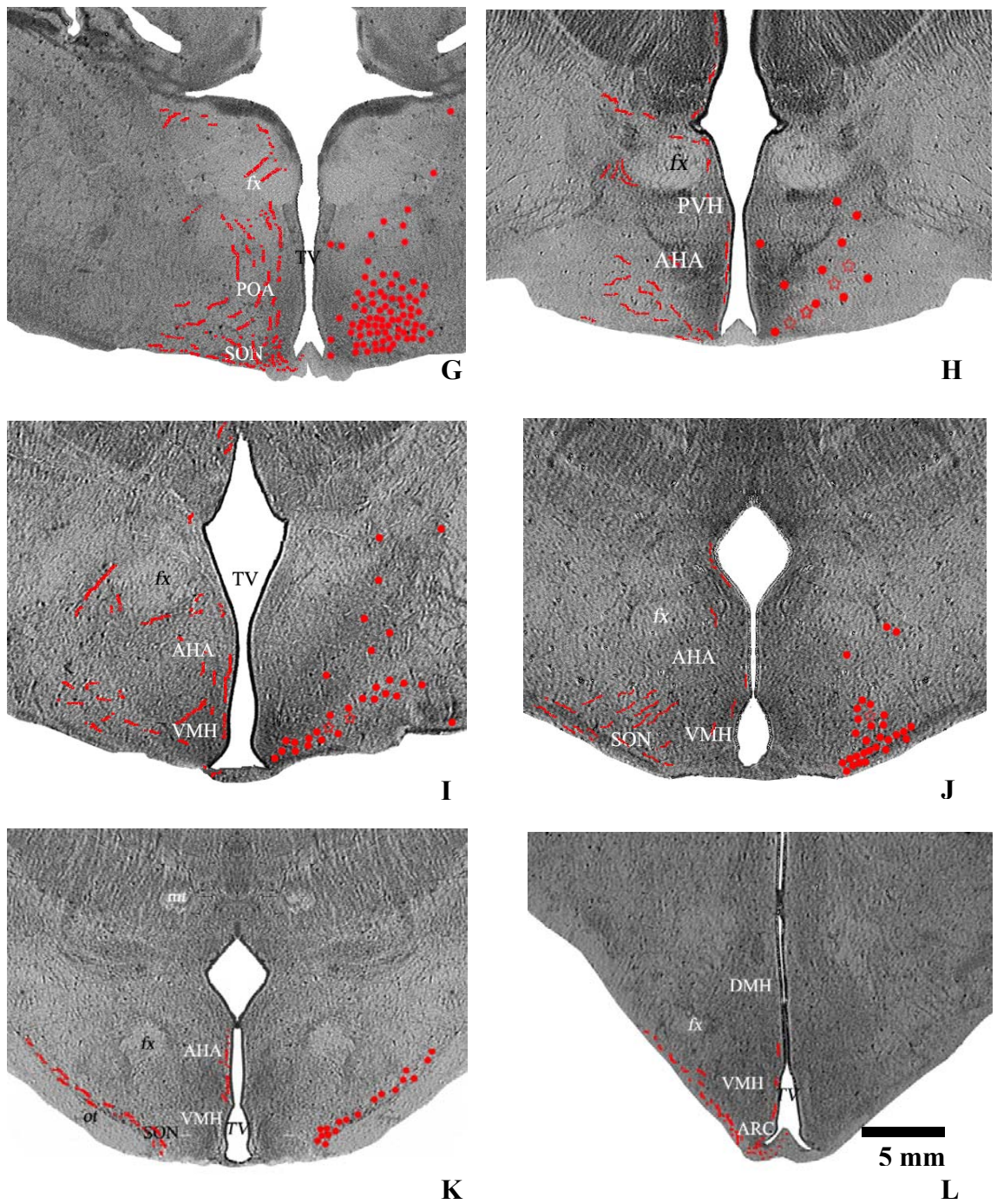
Otra zona rostral del hipotálamo rica en fibras fue el área septal (Figura 32 A, B, C y D). Algunas aparecieron inmediatamente ventral al cuerpo calloso y otras se observaron descendiendo tanto por el área septal lateral como por el área septal medial. También se observaron fibras GnRH-ir del hipotálamo rostral en la cercanía de la banda diagonal de Broca, la cápsula interna, entre las islas de Callejas y en el tubérculo olfatorio (Figura 32 C y D).

En el hipotálamo medio basal las fibras se encontraron agrupadas en los tractos descriptos. Sin embargo, el núcleo arcuato tuvo una regular cantidad de fibras GnRH-ir que continuaban hacia caudal para alcanzar el complejo mamilar siempre muy próximas a la línea mediana acompañando la prolongación del tercer ventrículo (Figura 33 L).



**Figura 32.** Secciones coronales obtenidas a partir de microfotografías del hipotálamo rostral de fetos de 12 semanas de desarrollo. Se grafican los somas neuronales (círculos rojos) y las fibras GnRH-ir (líneas rojas). Las estrellas rojas equivalen a 10 somas neuronales GnRHir. *ac*: comisura anterior; ACB: núcleo accumbens; BST: núcleo rojo de la estria terminal; CA: núcleo caudado; *cc*: cuerpo calloso; *cin*: cápsula interna; DBB: banda diagonal de Broca; *fx*: fornix; GLP: globus pallidus; IC: islas de Callejas; LV: ventrículo lateral; POA: área preóptica; PUT: putamen; SA: área septal; TO: tubérculo olfatorio; *tof*: tracto olfatorio; TV: tercer ventrículo





**Figura 33.** Secciones coronales obtenidas a partir de microfotografías del hipotálamo de fetos de 12 semanas de desarrollo. Se grafican los somas neuronales (círculos rojos) y las fibras GnRH-ir (líneas rojas). Las estrellas rojas equivalen a 10 somas neuronales GnRHir. AHA: área hipotalámica anterior; ARC: núcleo arcuato; DMH: núcleo hipotalámico ventro medial; *fx*: fornix; *mt*: tracto mamilotalámico; *ot*: tracto óptico; POA: área preóptica; PVH: núcleo paraventricular hipotalámico; SON: núcleo supraóptico; TV: tercer ventrículo; VMH: núcleo ventromedial hipotalámico

#### **4.4. Distribución de neuronas y fibras GnRH-ir en fetos bovinos de 16-18 semanas de desarrollo**

Los fetos bovinos de 16 a 18 semanas de desarrollo tuvieron el hipotálamo y las áreas diencefálicas adyacentes muy similares a las observadas en fetos de 12 semanas. De la misma forma, la ubicación de las neuronas GnRH-ir presentó una gran homología con la descripción hecha en el apartado anterior.

En esta categoría etaria se contabilizaron  $2319 \pm 192$  somas neuronales GnRH-ir que se localizaron principalmente en la parte rostral del hipotálamo. Estos cuerpos neuronales se distribuyeron en los mismos núcleos y áreas hipotalámicas que informamos para el período precedente. El área septal, el área preóptica, el área hipotalámica anterior y el núcleo supraóptico representaron los sectores donde se observó el 91,76% del total de las neuronas GnRH-ir. En las secciones coronales, los somas celulares GnRH-ir se encontraron, principalmente, en forma aislada o bien en pequeños grupos hasta de cinco neuronas GnRH-ir (Figura 34).

La mayor concentración de neuronas GnRH-ir hipotalámicas se ubicó en el área preóptica (42%) en la parte próxima al órgano vasculoso de la lámina terminal. En una estrecha banda de tejido ubicada ventral al área preóptica e inmediatamente dorsal al núcleo supraóptico se visualizó un 5,82% de los somas GnRH-ir. Por lo tanto, la mitad de la población GnRH se localizó en el área preóptica o en sus inmediaciones (Figura 34 C y D).

Desde este sector de máxima concentración de neuronas, la población de neuronas GnRH-ir se extendió tanto hacia rostral como hacia caudal dentro de las regiones hipotalámicas. Los cuerpos neuronales identificados por delante del área preóptica representaron el 19,53% del total de la población GnRH y se distribuyeron principalmente en la región medial del área

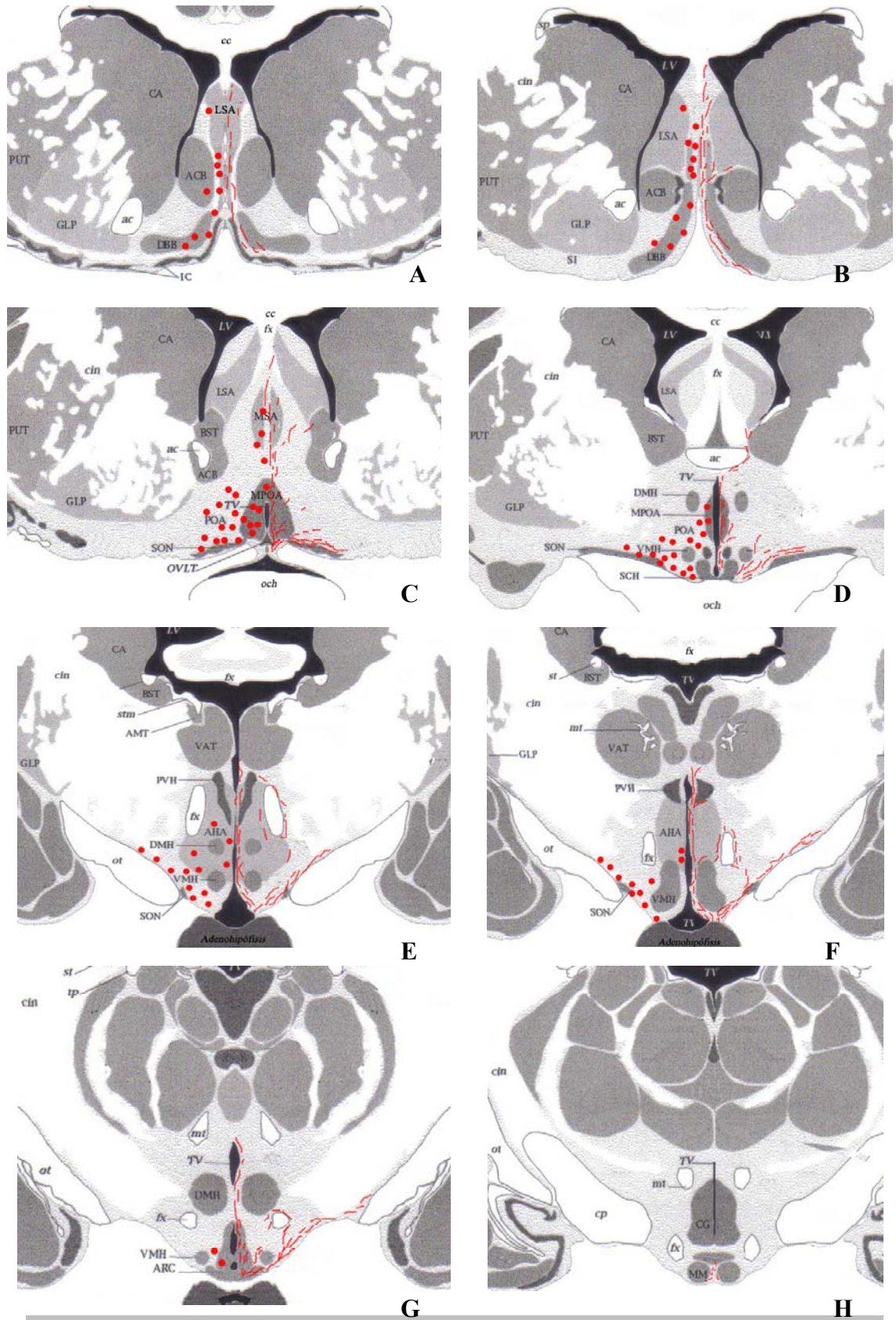
septal (11,62%) y la banda diagonal de Broca (7,36%). Las restantes neuronas se hallaron en el núcleo acumbens (0,53%) y tubérculo olfatorio (0,02%) (Figura 34 A a D).

Las neuronas GnRH-ir ubicadas caudal al área preóptica representaron el 31,51% del total de la población y se extendió hasta los niveles más caudales del núcleo arcuato donde fue posible observar escasos cuerpos neuronales GnRH-ir. Estas neuronas se observaron distribuidas en forma difusa en el área hipotalámica anterior (14,1%) y en la parte dorsal del núcleo supraóptico (10,86%). Al igual que en los fetos de 12 semanas se observaron numerosas neuronas en un área de baja densidad celular ubicada entre el supraóptico, el área hipotalámica anterior y el núcleo arcuato. Estas neuronas GnRH-ir aparecieron dorsales al núcleo supraóptico (3,75%) y también dorsales al núcleo arcuato (2,8%) (Figura 34 C - G).

Finalmente, el 1,13% de las neuronas GnRH-ir se hallaron en áreas extrahipotalámicas similares a las especificadas para los fetos de 12 semanas.

El patrón de distribución de las fibras GnRH-ir no tuvo variaciones importantes a lo observado en los fetos de la categoría etaria previamente explicada. La principal diferencia radicó en que se hallaron muy escasa cantidad de fibras GnRH-ir oblicuas y perpendiculares al núcleo supraóptico y al tracto óptico con una dirección dorso medial que provenían de las neuronas GnRH-ir que se ubicaban con la misma dirección (Figura 34).





**Figura 34.** Representación gráfica de las principales regiones del hipotálamo rostral de fetos de 16-18 semanas de desarrollo. Se grafican los somas neuronales (círculos rojos) y las fibras GnRH-ir (líneas rojas). ACB: n. acubens; AHA: a. hipotálamica anterior; ARC: n. arcuato; ac:comisura anterior; BST: n. estriado; CA: n. caudado; cc:cuerpo calloso; cin: cápsula interna; DBB: banda diagonal de Broca; DMH: n. hipotálamico dorsomedial; fx: fornix; GLP: globus pallidus; IC: islas de Callejas; LSA: a. septal lateral; LV: ventrículo lateral; MM: núcleos de los cuerpos mamilares; MPOA: a. preóptica medial; MSA: a. septal medial; mt: tracto mamilotalámico; och: quiasma óptico; ot:tracto óptico; OVLT: órgano vasculoso de la lámina terminal; PVH: n. hipotálamico paraventricular; PUT: putamen; SCH: n. supraquiasmático; SON: n. supraóptico; TV: tercer ventrículo; VAT: n. talámico ventro-anterior; VMH: n. hipotálamico ventro medial. Esquema sin escala.

#### **4.5. Distribución de neuronas y fibras GnRH-ir en fetos bovinos de 21-22 semanas de desarrollo**

Al igual que en fetos de 12, 16 y 18 semanas, las neuronas GnRH-ir en secciones coronales provenientes de individuos de 21-22 semanas de desarrollo se encontraron en forma aislada o bien en pequeños grupos de hasta de cinco células. Estas somas GnRH-ir se estimaron en  $2201 \pm 382$  por individuo y se localizaron principalmente en la parte rostral del hipotálamo. Sin embargo, las neuronas GnRH-ir visualizadas en el área septal, la banda diagonal de Broca, el área preóptica, el área hipotalámica anterior y el núcleo supraóptico representaron el 92,43% del total de la población GnRH (Figura 35).

La mayor concentración de neuronas GnRH-ir hipotalámicas se ubicó en el área preóptica (41,26%) en las cercanías del órgano vasculoso de la lámina terminal, aunque también hubo un 4,9% de cuerpos neuronales ventral a este núcleo en la cercanía del núcleo supraóptico, ubicándose el 46,16% de los somas GnRHir en esta región (Figura 35 C y D).

Las neuronas GnRH-ir ubicadas hacia rostral del área preóptica representaron el 19,23% del total de la población y aparecieron irregularmente distribuidas en la región medial del área septal (10,65%) y la banda diagonal de Broca (8,56%). Sólo un mínimo porcentaje (0,02%) se identificó en la parte medial del núcleo acumbens (Figura 35 A, B y C).

En la región hipotalámica caudal al área preóptica, en la cual se detectó la presencia de neuronas GnRH-ir hasta el núcleo arcuato, se ubicó el 33,55% de la neuronas GnRH-ir, las que se distribuyeron principalmente en el área hipotalámica anterior (14,45%) y el núcleo supraóptico (12,61%). Las restantes neuronas GnRH-ir se distribuyeron en un área comprendida entre el núcleo supraóptico y el área hipotalámica anterior (2,97%) y el núcleo arcuato (3,52%) (Figura 35 C - G). Finalmente, el 0,97% de las neuronas GnRH-ir se halló en áreas extrahipotalámicas.



No se observaron diferencias en el patrón de distribución de las fibras GnRH-ir comparativamente a lo encontrado en los fetos de 12 y 16-18 semanas de desarrollo. En el tubérculo olfatorio y tracto olfatorio no se hallaron fibras GnRH-ir las que se encontraban presentes hasta el período anterior.

#### **4.6. Distribución de neuronas y fibras GnRH-ir en bovinos pre-púberes**

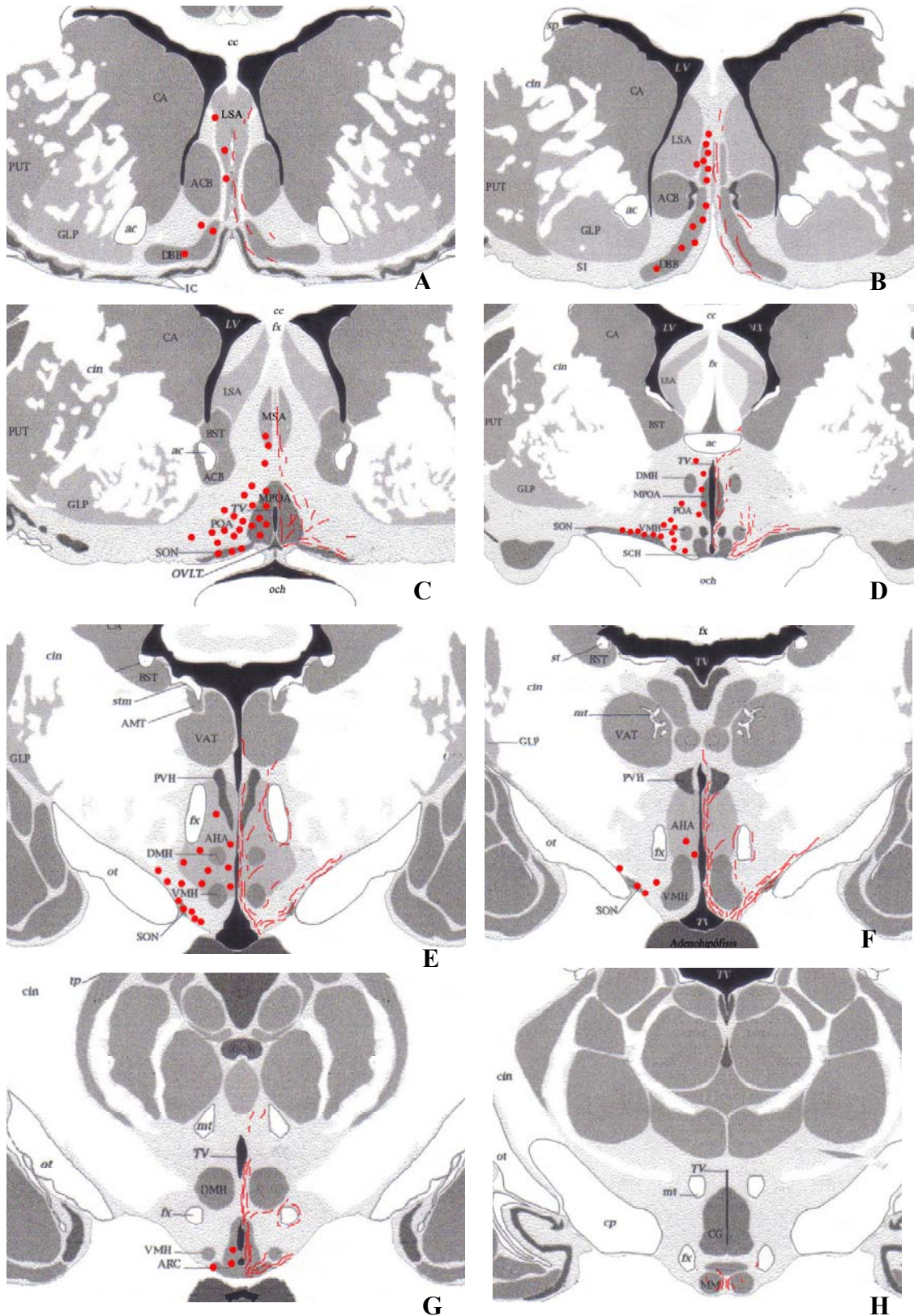
Las secciones coronales del hipotálamo de animales jóvenes (terneros) fueron en todo representativas de la citoarquitectura hipotalámica de un bovino adulto. Las neuronas GnRH-ir ( $2083 \pm 223$ ) se localizaron principalmente en los núcleos y las áreas de la parte rostral del hipotálamo en una distribución muy similar a la observada en los fetos de 16-18 y 21-22 semanas.

Las neuronas GnRH-ir se observaron dispersas en distintos núcleos y áreas hipotalámicas que incluyeron el área septal, la banda diagonal de Broca, el área preóptica, el área hipotalámica anterior y el núcleo supraóptico. Estas regiones tuvieron el 93,03% del total de las neuronas GnRH-ir y los somas celulares se visualizaron en forma aislada, si bien es posible encontrar algunas agrupadas en pequeños conjuntos de cinco neuronas GnRH-ir (Figura 36)

El área de mayor concentración de neuronas GnRH-ir del hipotálamo fue el área preóptica que contuvo el 45,2% de los somas. Las zonas del área preóptica próximas al órgano vasculoso de la lámina terminal son las más abundantes en somas celulares GnRH-ir. Además por debajo del área preóptica e inmediatamente dorsal al núcleo supraóptico, en un área de escasa densidad neuronal, también se observó la presencia de somas GnRH-ir que representaron el 4% de la población total. Por lo tanto, el área preóptica y sus sectores vecinos contuvieron el 49% del sistema GnRH de los bovinos (Figura 36 C y D). La otra mitad de la

población se ubicó o bien rostral al área preóptica (20,6%), (Figura 36 A y B) o bien en caudal de este área celular en el hipotálamo mediobasal (29,39%) (Figura 36 E, F y G).

En la extensión rostral, los somas GnRH-ir se observaron principalmente en la región medial del área septal (11,21%) y la banda diagonal de Broca (8,52%). Sólo un pequeño porcentaje de estas neuronas (0,33%) se visualizaron en núcleos ubicados fuera del hipotálamo como el núcleo acumbens (Figuras 36 A, B y C).



**Figura 35.** Representación gráfica de las principales regiones del hipotálamo rostral de fetos de 21-22 semanas de desarrollo. Se grafican los somas neuronales (círculos rojos) y las fibras GnRH-ir (líneas rojas). ACB: n. acubens; AHA: a. hipotalámica anterior; ARC: n. arcuato; ac:comisura anterior; BST: n. estriado; CA: n. caudado; cc:cuerpo calloso; cin: cápsula interna; DBB: banda diagonal de Broca; DMH: n. hipotalámico dorsomedial; fx: fornix; GLP: globus pallidus; IC: islas de Callejas; LSA: a. septal lateral; LV: ventrículo lateral; MM: núcleos de los cuerpos mamilares; MPOA: a. preóptica medial; MSA: a. septal medial; mt: tracto mamilotálámico; och: quiasma óptico; ot:tracto óptico; OVLT: órgano vasculoso de la lámina terminal; PVH: n. hipotalámico paraventricular; PUT: putamen; SCH: n. supraquiasmático; SON: n. supraóptico; TV: tercer ventrículo; VAT: n. talámico ventro-anterior; VMH: n. hipotalámico ventro medial. Esquema sin escala.

Los cuerpos de las neuronas GnRH-ir ubicadas en el hipotálamo mediobasal se distribuyeron difusamente hasta alcanzar el núcleo arcuato. En esta proyección caudal al área preóptica, las neuronas GnRH-ir se encontraron ampliamente esparcidas en el área hipotalámica anterior (12,89%) y se agruparon en forma muy compacta en la parte dorsal del núcleo supraóptico (11,21%). Por debajo del área hipotalámica anterior e inmediatamente dorsal al núcleo supraóptico, en un sector de escasa densidad celular, se visualizó el 1,65% de las restantes neuronas GnRH-ir, mientras que el núcleo arcuato y la región periacuata contuvieron sólo el 3,64% de la población neuronal (Figura 36 D - G).

Las neuronas GnRH-ir observadas en regiones ubicadas fuera del hipotálamo representaron un 1,3% de la población total. Estos somas GnRH-ir se observaron, principalmente, en el área subcallosa, la amígdala y el complejo habenular.

Las fibras GnRH-ir se observaron en gran cantidad en la banda diagonal de Broca, el área septal, el área preóptica, el núcleo supraóptico, el órgano vasculoso de la lámina terminal, la eminencia media, el núcleo arcuato y en el tallo infundibular de la hipófisis. La mayor concentración de fibras GnRH-ir se encontró en la eminencia media y el órgano vasculoso de la lámina terminal que representan los sectores donde finalizan los axones del sistema. Las fibras GnRH-ir que alcanzan la eminencia media se distribuyeron ampliamente en toda su extensión y se observaron los capilares primarios del sistema porta rodeados de abundante material inmunorreactivo (Figura 37 B). En el órgano vasculoso de la lámina terminal las fibras forman una densa red que ocupa la parte más dorsal de este órgano.

Sin embargo, también se visualizaron fibras en la estría terminal, los núcleos de la amígdala, el complejo habenular y los núcleos mamilares. Por otro lado, en el tallo de la glándula pituitaria se observaron abundantes fibras GnRH-ir que realizaron un recorrido descendente hacia la parte nerviosa de la glándula.

Tanto en el área preóptica como en el área hipotalámica anterior los somas neuronales aparecieron rodeados de fibras GnRH-ir que finalizaron agrupándose en dos tractos con recorridos similares a lo observado en los fetos a partir de las 12 semanas de edad. De manera que se visualizó un fascículo caudo-ventral que cursó acompañando al fascículo basal del prosencéfalo inmediatamente dorsal del núcleo supraóptico y se extendió hasta la eminencia media y el tallo infundibular. El otro fascículo de fibras GnRH-ir recorrió el hipotálamo por las áreas periventriculares que rodean el tercer ventrículo hasta alcanzar el núcleo arcuato donde finalizaron en una red en el interior de la eminencia media (Figura 37 A y B)

Algunas fibras GnRH-ir se visualizaron dentro del complejo mamilar, cercanas al plano medio y representaron la proyección más caudal del sistema GnRH.

No se observaron cuerpos de neuronas, ni fibras GnRH-ir en los distintos sectores del sistema olfatorio (bulbo y tubérculo olfatorio) de los terneros, tal como se presentaban en los fetos de distintas edades.

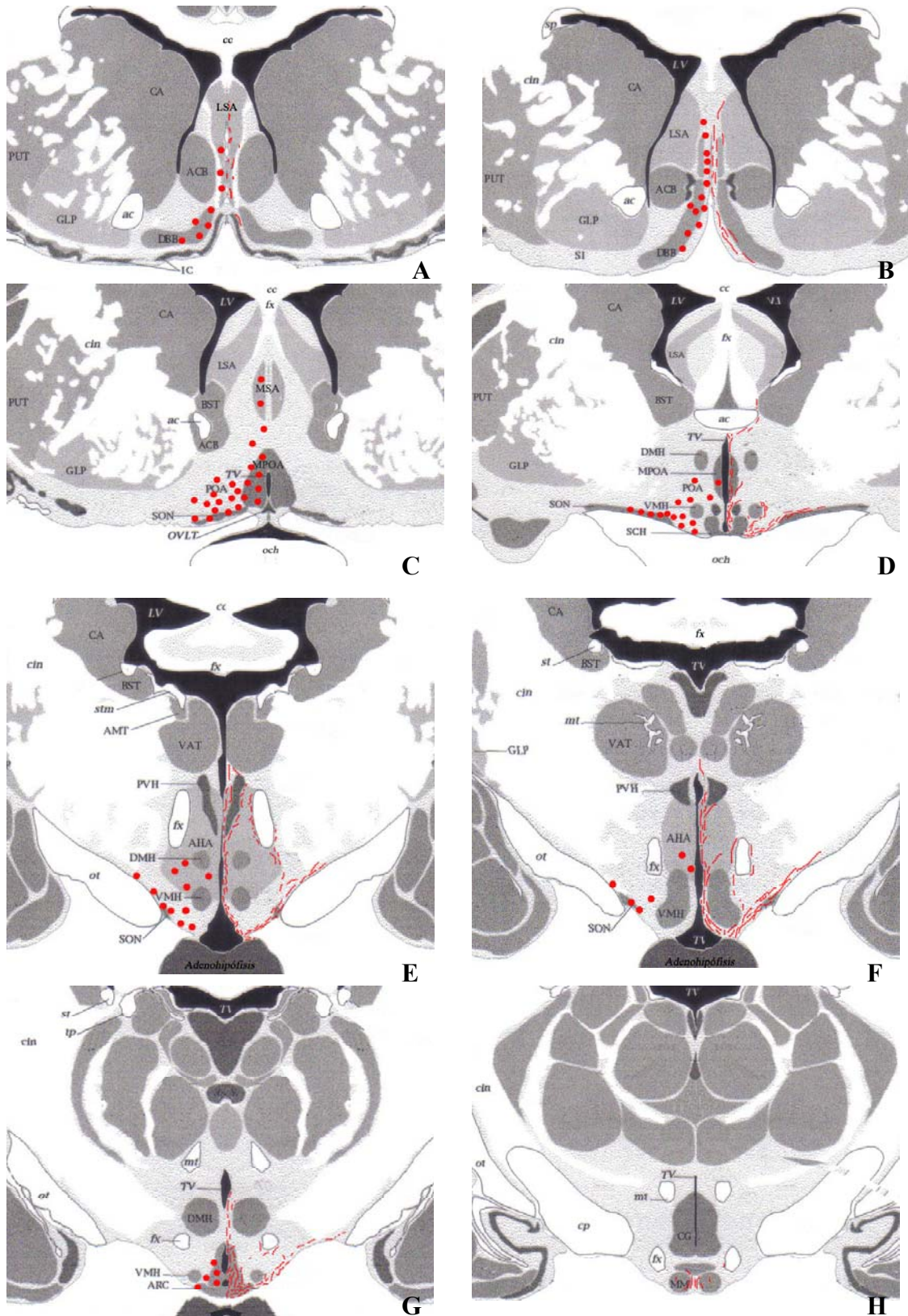
Finalmente, se concluye que la distribución de los somas GnRHir en los fetos de 12 semanas fue significativamente diferente ( $P \leq 0.01$ ) en el tubérculo olfatorio, la cápsula interna, el núcleo arcuato y las áreas comprendidas debajo del área preóptica e inmediatamente dorsal al núcleo supraóptico y el área comprendida entre el área hipotalámica anterior y el núcleo supraóptico con respecto a los fetos de mayor edad y animales prepúberes.

Tabla 11. Porcentaje de somas neuronales GnRH-ir en distintas edades del desarrollo y en bovinos prepúberes.

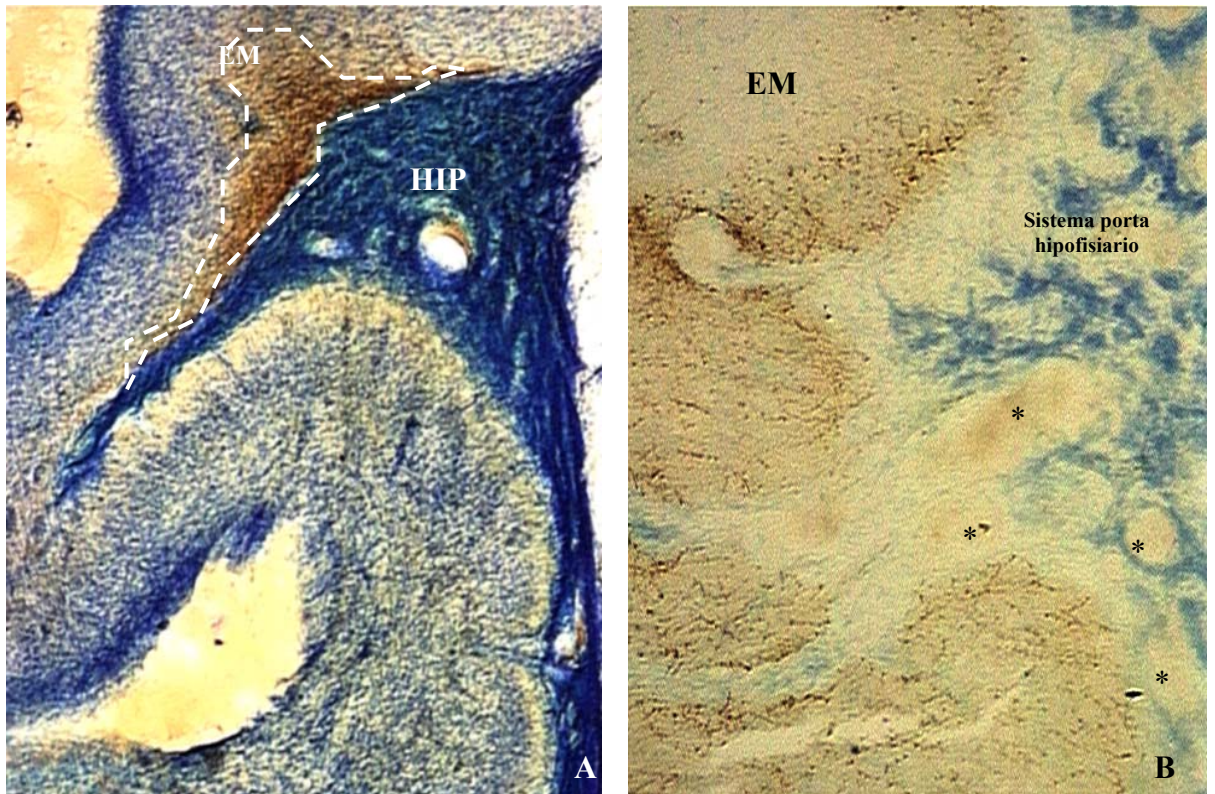
Edad (sem)	% de neuronas GnRH-ir en núcleos y áreas hipotalámicos												
	TO	DBB	SA	CIN	CA	ACB	POA	<sup>1</sup> POA-SON	SON	AHA	<sup>2</sup> AHA-SON	ARC	EXH
12	0,92	4,32	12,19	0,88	0,05	2,00	32,5	16,7	9,92	9,81	9,02	0,7	0,88
16-18	0,02	7,36	11,62	0	0	0,53	42	5,8	10,86	14,10	3,75	2,8	1,13
21-22	0	8,56	10,65	0	0	0,02	41,2	4,9	12,61	14,45	2,97	3,52	0,97
PP	0	8,52	11,21	0	0	0,33	45,2	4	11,21	12,89	1,65	3,6	1,32

PP: bovino prepúber 1: área comprendida debajo del POA e inmediatamente dorsal al SON. 2: área comprendida entre el AHA y el SON.





**Figura 36.** Representación gráfica de las principales regiones del hipotálamo rostral de animales prepúberes bovinos. Se grafican los somas neuronales (círculos rojos) y las fibras GnRH-ir (líneas rojas). ACB: n. acubens; AHA: a. hipotalámica anterior; ARC: n. arcuato; ac:comisura anterior; BST: n. estriado; CA: n. caudado; cc:cuerpo calloso; cin: cápsula interna; DBB: banda diagonal de Broca; DMH: n. hipotalámico dorsomedial; fx: fornix; GLP: globus pallidus; IC: islas de Callejas; LSA: a. septal lateral; LV: ventrículo lateral; MM: núcleos de los cuerpos mamilares; MPOA: a. preóptica medial; MSA: a. septal medial; mt: tracto mamilotalámico; och: quiasma óptico; ot:tracto óptico; OVLT: órgano vasculoso de la lámina terminalis; PVH: n. hipotalámico paraventricular; PUT: putamen; SCH: n. supraquiasmático; SON: n. supraóptico; TV: tercer ventrículo; VAT: n. talámico ventro-anterior; VMH: n. hipotalámico ventro medial. Esquema sin escala.



**Figura 37.** Zona inmunoreactiva (línea blanca) de la eminencia media (EM) conteniendo fibras y GNRH-ir libre en contacto con la hipófisis (HIP, 40X, A); y fibras y GNRH-ir libre en la eminencia media (EM) en contacto con los vasos sanguíneos del sistema porta hipofisiario (100X, B). Los asterísticos indican vasos sanguíneos.

#### 4.7. Cantidad y parámetros morfométricos de las neuronas GnRH-ir

##### 4.7.1. Número de neuronas GnRH-ir

Durante la vida fetal, el promedio de neuronas GnRH-ir para las diferentes categorías etarias consideradas en este estudio fue estimado en  $2054 \pm 283$ , con un rango de 1554 a 2459. El número total de neuronas GnRH-ir estimado para cada intervalo de edad fue: 8 semanas  $1855 \pm 238$ , 12 semanas  $2161 \pm 231$ , 16-18 semanas  $2268 \pm 191$  y 21-22 semanas  $2203 \pm 210$  mientras que en los animales pre-púberes, el promedio estimado de neuronas GnRH-ir fue de  $2083 \pm 158$  con un rango de 1925 a 2241. Los datos consignados no fueron significativamente

diferentes ( $P \geq 0.05$ ) en el número total de somas neuronales GnRH-ir entre las diferentes edades estudiadas.

#### **4.7.2. Morfometría de neuronas GnRH-ir**

A las 8 semanas del desarrollo se identificaron dos tipos morfológicos de neuronas GnRH-ir. El primer tipo celular se caracterizó por su aspecto redondeado y por poseer prolongaciones muy cortas o carecer de ellas, con una morfología compatible con células de tipo neuroblástico. Estas células midieron  $17 \times 11 \mu\text{m}$  (Tabla 11), aparecieron en un número variable de acuerdo con la edad en días del individuo y solamente se localizaron en el epitelio que tapiza la parte rostral de la cavidad nasal y el órgano vomeronasal de los fetos (Figura 38 A, B y C).

El segundo tipo morfológico correspondió a células grandes de  $20\text{-}27 \times 9\text{-}10 \mu\text{m}$ , con soma fusiforme, núcleos grandes, esféricos y negativos a la IHQ. Estas células presentaron dos largas prolongaciones en sus extremos y eran compatibles con neuronas bipolares de aspecto fusiforme (Figura 38 D, E, F y 39 A - B). Estas neuronas bipolares GnRH-ir se localizaron en diferentes sectores de la cavidad nasal sobre los nervios vomeronasales, en el recorrido nasal de las fibras del nervio terminal y desde la intersección naso-encefálica hasta el interior del prosencéfalo secundario (Figura 38 D, E, F y 39 A - D). Los parámetros morfométricos para cada uno de los tipos de neuronas bipolares GnRH-ir consideradas tuvieron variaciones significativas según la localización anatómica en que se encontraban.

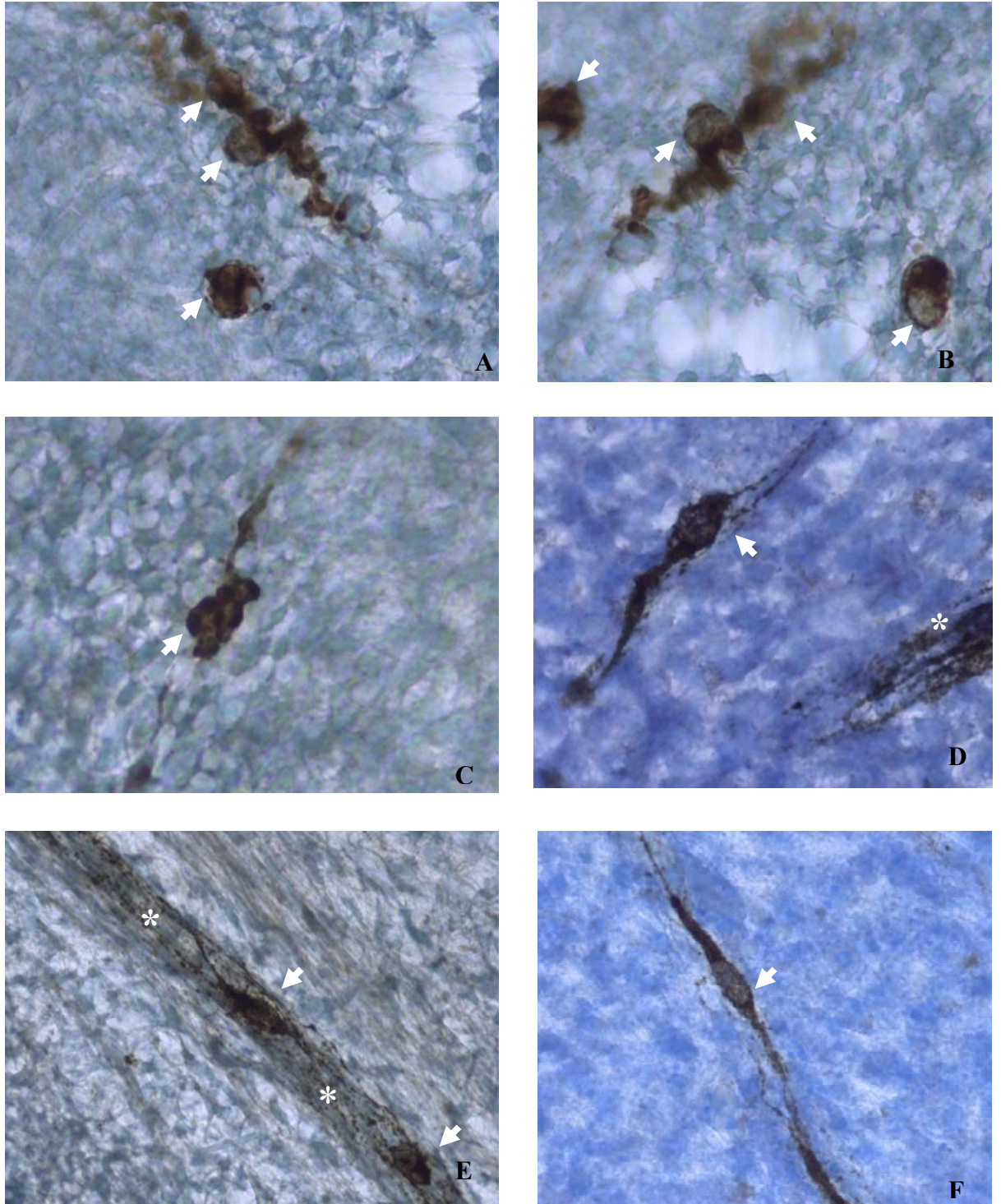
La superficie de las neuronas NGCNa fue significativamente mayor ( $P \leq 0.0001$ ) con respecto al resto de las neuronas visualizadas en las otras regiones. Sin embargo, no existieron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) entre la superficie de las neuronas de las restantes regiones entre sí. El perímetro y la longitud del eje mayor de los somas neuronales GnRH-ir difirieron



significativamente ( $P \leq 0.0001$ ) entre los distintos grupos neuronales, siendo las neuronas NGCNa las de mayor perímetro y largo del eje mayor. En forma similar las neuronas NGNT difirieron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) para ambos parámetros con respecto a NGB y NGE.

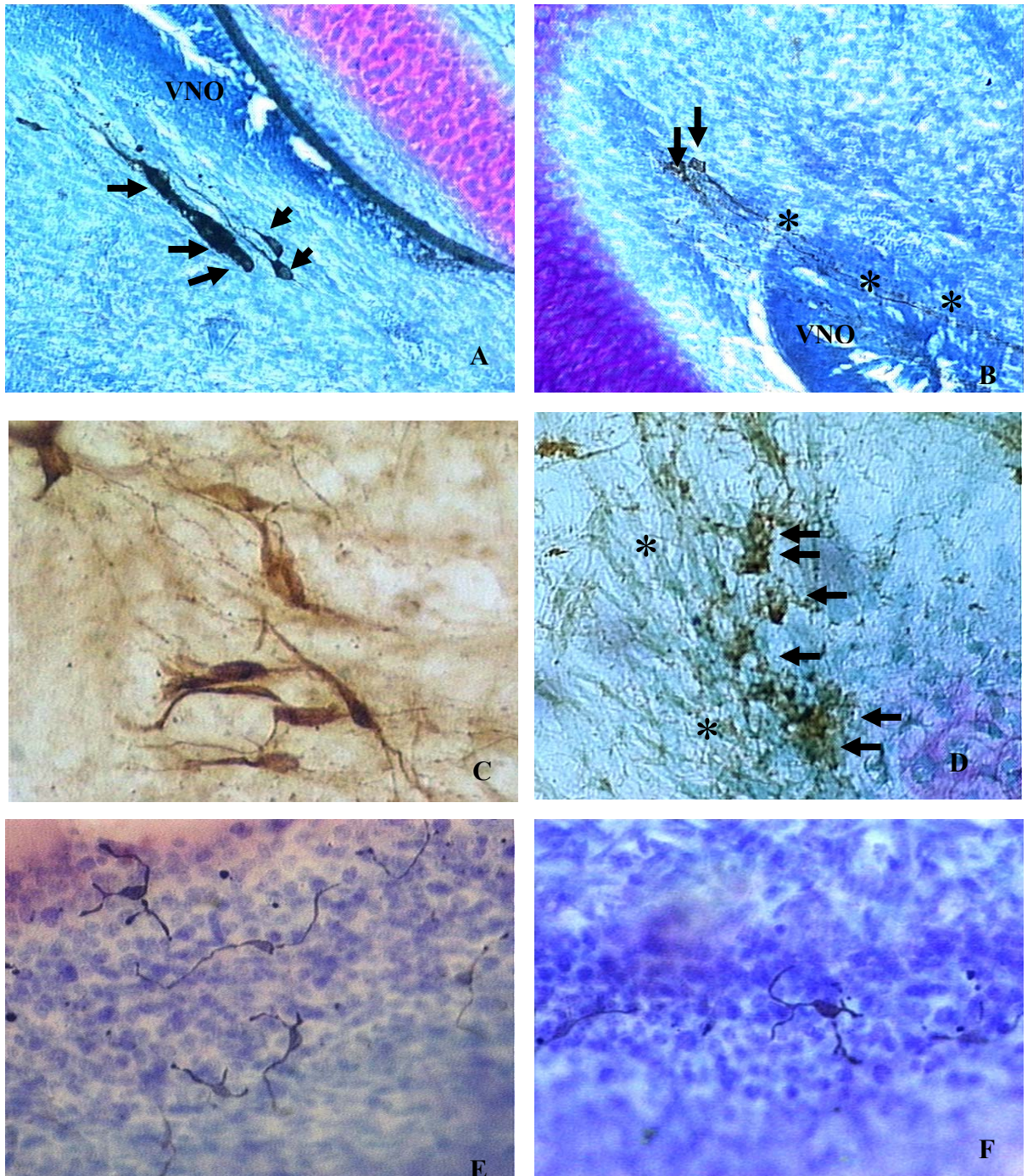
El eje menor de las NGB ( $P \leq 0.0001$ ) difirió significativamente con respecto a los restantes grupos celulares, y el eje menor de las NGCNa difirió significativamente ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a los valores de NGT y NGE.

El ID de las NGB fue significativamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) al resto de los tipos celulares indicando que este tipo celular presentó una forma esférica u ligeramente oval. Sin embargo, el ID de las NGCNa fue el mayor valor obtenido para este parámetro y difirió significativamente ( $P \leq 0.0001$ ) de los otros grupos neuronales (NGB, NGNT y NGE), hecho que evidenció que estas neuronas bipolares son las de mayor tamaño y con mayor elongación del soma (Tablas 11 y 12).



**Figura 38.** Fotografías de las células tipo neuroblásticas GnRHir (NGB) aisladas (A y B) o agrupadas (C) en el epitelio nasal de fetos bovinos de la 8<sup>va</sup> semana de edad gestacional. Células bipolares migrantes (NGCNa) y fibras GnRHir durante la migración en la cavidad nasal (D, E y F). Las flechas blancas indican las células y los (\*) las fibras GnRHir (400X).





**Figura 39.** Fotografías de neuronas bipolares (A) y fibras GnRHir (B) en las adyacencias del órgano vomeronasal (VNO, 200X ); neuronas bipolares GnRHir (C) en el prosencéfalo fetal, sin tinción de contraste. (400X); neuronas y fibras GNRHir (D) sobre el trayecto del nervio terminal en la intersección nasoencefálica e intracraneal (200X); células marcadas en la epidermis de la región frontonasal (F, 200X). Todas las fotografías pertenecen a fetos de 8 semanas de edad gestacional

**Tabla 12.** Parámetros morfométricos de las neuronas GnRH-ir en fetos bovinos de la 8<sup>va</sup> semana de gestación (valores medios y error estándar).

Grupo neuronal	n	Superficie (µm <sup>2</sup> )		Perímetro (µm)		Eje mayor (µm)		Eje menor (µm)		ID
		min	max	min	max	min	max	min	max	
NGB	50	140,16±37,16	46,83±6,8	15,7±2,19	11,26±2,05*	1,42±0,26**				
NGCNa	108	219,95±101,4*	70,35±20,41*	27,73±7,91*	9,9±2,79**	2,99±1,21*				
NGNT	106	140,86±38,54	52,7±10,7**	20±4,87**	9,05±1,81	2,32±0,82				
NGE	120	126,2±40,13	46,99±9,96	17,93±4,27	8,9±1,66	2,07±0,56				

ID:= Índice de redondez. Dentro de la columna: \*P≤0.0001; \*\*P≤0.05

**Tabla 13.** Parámetros morfométricos de las neuronas GnRH-ir en fetos bovinos de la 8<sup>va</sup> semana de gestación (valores máximos y mínimos).

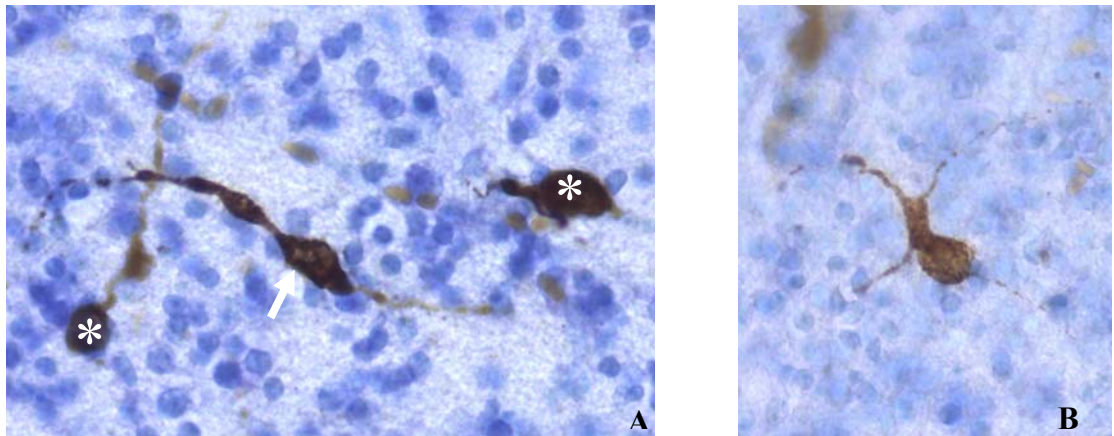
Grupo neuronal	n	Superficie (µm <sup>2</sup> )		Perímetro (µm)		Eje mayor (µm)		Eje menor (µm)		ID	
		min	max	min	max	min	max	min	max	min	max
NGB	50	84,43	211,22	35,3	60,28	11,7	20,7	8,54	16,17	1,03	2,2
NGCNa	108	76,18	454,9	43,41	124,4	15,34	45,5	5,28	16,3	1,36	6,76
NGNT	106	68,97	254,27	34,32	82,96	12,22	33,76	5,67	12,48	1,03	4,88
NGE	120	54,27	232,56	28,62	68,14	11,19	27,65	5,8	13,3	1,21	3,58

ID:= Índice de redondez.

En los fetos de la 8<sup>va</sup> semana de desarrollo, también se observan células reactivas en la epidermis que cubre la región fronto-nasal y el ápex de la nariz. Esta población de células positivas a la reacción de peroxidasa no han sido consideradas como GnRH-ir debido a que su presencia se constata tanto en las secciones incubadas con el anticuerpo LHR13, como en las secciones controles incubadas sin el anticuerpo LHR13. Estas células de aspecto bipolar y multipolar, se caracterizaron por poseer un soma de forma variable, desde fusiforme hasta poliédrico, con largas y numerosas prolongaciones y con medidas aproximadas de 9-20 x 5-12 µm (Figura 39 E y F).

A partir de la 12<sup>da</sup> semana del desarrollo hasta el período prepuberal las neuronas GnRH-ir también poseen diferentes aspectos morfológicos. Sin embargo, las neuronas GnRH-ir de este período pueden ser clasificadas en dos tipos: un tipo fusiforme bipolar (donde también pueden

observarse neuronas con prolongaciones en “T”, unipolares y esféricas) y otro subtipo multipolar (Figura 40).



**Figura 40.** Fotografías de neuronas GnRH.ir de fetos de 12 semanas de edad gestacional. Neurona bipolar GnRHir (A, flecha) y diferentes cortes neuronales (\*). Neurona multipolar (B, 400X)

A partir de la 12<sup>da</sup> semana de gestación hasta la etapa prepuberal, el  $98,17 \pm 0,47\%$  de las neuronas GnRH-ir observadas eran fusiformes bipolares y no se encontraron diferencias estadísticas ( $P \geq 0,05$ ) en la cantidad de neuronas GnRH-ir bipolar entre las diferentes edades estudiadas.

Las neuronas bipolares de los fetos se caracterizaron por poseer largas prolongaciones y en una de ellas se observó una dilatación esférica cercana al soma celular. Sin embargo, algunas de estas neuronas ( $0,57 \pm 0,17\%$ ) presentaron en uno de sus extremos una corta prolongación que se bifurcaba en forma comparable a la letra “T”.

Por otro lado, la población de neuronas GnRH-ir multipolares estimada fue escasa ( $1,26 \pm 0,3\%$ ) y sin una localización específica, ya que aparecieron distribuidas irregularmente tanto en el área septal y el área preóptica, como en el área hipotalámica anterior.

Las neuronas GnRH-ir fetales (12-22 semanas de desarrollo) fueron significativamente diferentes ( $P \leq 0.0001$ ) en la superficie, el perímetro, el eje mayor y el eje menor con respecto a las neuronas de los terneros prepúberes (Tabla 13).

También, se encontraron diferencias significativas en los siguientes parámetros morfométricos: la superficie del soma neuronal ( $P \leq 0.0001$ ), el perímetro ( $P \leq 0.0001$ ), el eje mayor ( $P = 0.0003$ ) y el eje menor ( $P = 0.02$ ) de las neuronas GnRH-ir de los fetos de 12 semanas con respecto a los de 16-22 semanas de edad gestacional. Sin embargo, no existen diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) para estos parámetros entre las neuronas GnRH-ir de los fetos desde la 16<sup>a</sup> hasta la 22<sup>a</sup> semana del desarrollo (Tablas 14 y 15).

El ID no varía a lo largo del desarrollo prenatal y tampoco se han observado diferencias entre las edades fetales estudiadas y los animales prepúberes (Tablas 13, 14 y 15)

**Tabla 14.** Morfometría de las neuronas GnRH-ir en fetos (12<sup>da</sup> - 22<sup>da</sup> semana de gestación) y bovinos pre-púberes (valores medios y error estándar).

Período	n	Superficie ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Eje mayor ( $\mu\text{m}$ )	Eje menor ( $\mu\text{m}$ )	ID
<b>Fetal</b>	466	156,88 $\pm$ 5,17	59,97 $\pm$ 1,22	19,9 $\pm$ 0,47	10,01 $\pm$ 0,22	2,04 $\pm$ 0,07
<b>Prepúber</b>	168	216,96 $\pm$ 5,52*	67,12 $\pm$ 1,3*	23,27 $\pm$ 0,51*	11,9 $\pm$ 0,24*	2,01 $\pm$ 0,08

ID:= Índice de redondez. Dentro de la columna: \* $P \leq 0.0001$

**Tabla 15.** Morfometría de las neuronas GnRH-ir en fetos bovinos de la 12<sup>da</sup> a la 22<sup>da</sup> semana de gestación (valores medios y error estándar).

Edad (semanas)	n	Superficie ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Eje mayor ( $\mu\text{m}$ )	Eje menor ( $\mu\text{m}$ )	ID
<b>11-12</b>	211	141,1 $\pm$ 2,84*	51,13 $\pm$ 0,67*	18,71 $\pm$ 0,26**	9,65 $\pm$ 0,12***	2,02 $\pm$ 0,04
<b>16-18</b>	117	170 $\pm$ 6,61	64,94 $\pm$ 1,56	20,69 $\pm$ 0,61	10,39 $\pm$ 0,29	2,04 $\pm$ 0,09
<b>21-22</b>	138	159,52 $\pm$ 6,1	63,85 $\pm$ 1,43	20,31 $\pm$ 0,56	10 $\pm$ 0,26	2,08 $\pm$ 0,09

ID:= Índice de redondez. Dentro de la columna: \* $P \leq 0.0001$ ; \*\* $P = 0.0003$ ; \*\*\* $P = 0.02$ .



**Tabla 16.** Morfometría de las neuronas GnRH-ir en fetos de la 12<sup>da</sup> a la 22<sup>da</sup> semana de gestación y bovinos pre-púberes (valores mínimos y máximos).

Edad (semanas)	n	Superficie ( $\mu\text{m}^2$ )		Perímetro ( $\mu\text{m}$ )		Eje mayor ( $\mu\text{m}$ )		Eje menor ( $\mu\text{m}$ )		ID	
		min	Max	min	max	min	Max	min	max	min	max
<b>11-12</b>	211	54,64	290,25	31,81	81,27	10,92	29,79	4,78	14,38	1,14	4,47
<b>16-18</b>	117	91,84	316,54	43,87	90,65	13,97	28,87	7,23	15,16	1,29	2,91
<b>21-22</b>	138	62,21	241,80	46,19	79,16	14,71	25,21	4,78	12,80	1,39	3,47
<b>Prepúber</b>	168	124,56	348,94	46,66	87,03	16,18	34,44	8,35	16,23	1,12	3,47

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Consideraciones de los aspectos metodológicos empleados.

Este ha sido el primer estudio del que tenemos registro donde se propone el uso de material bovino procedente de la industria frigorífica para estudios específicos de desarrollo embrionario. La estimación de la edad de los embriones y fetos utilizada siguiendo las ecuaciones de Kähn (260) ha resultado apropiada para ubicar los ejemplares en un período del desarrollo determinado aunque fue inadecuado para precisar la edad exacta del individuo. La falta de correlación entre la edad fetal en días y la cantidad de neuronas GnRH-ir de cada tipo morfológico (neuroblásticas o bipolares), así como la ubicación anatómica (interior de la cavidad nasal, intersección naso-encefálica o encefálicas) durante el proceso migratorio en la 8<sup>va</sup> semana pudo ser debida a la imprecisión del método utilizado para estimar la edad en días. Procesos de cambios embrionarios tan rápidos, como sería la migración de las neuronas GnRH-ir, exigirían métodos de estimación de la edad más rigurosos, debido a que diferencias de 24 horas representarían una ventana temporal demasiado grande. Existieron importantes desventajas para estimar la edad de ejemplares de menos de 9-10 semanas de desarrollo: por ejemplo, el largo fetal (LCC) fue el único parámetro que tiene una alta correlación con la edad del individuo en estos períodos del desarrollo, por lo cual no existió la posibilidad de promediar o corregir la estimación con otras medidas. En este caso, si bien el tamaño de la muestra que se utilizó fue estadísticamente correcto para ubicar el proceso de la migración dentro de un período del desarrollo, el tamaño de la muestra y el método de estimación de la edad fueron insuficientes para establecer una correlación apropiada entre la ubicación de las neuronas GnRH-ir y los días dentro de la 8<sup>va</sup> semana del crecimiento fetal. Por otro lado, el crecimiento fetal, y por ende el tamaño del feto, está influenciado por la carga genética del individuo. Si bien por la metodología utilizada se sabe la raza materna (genética materna),



más allá de la variación genética inherente a la raza, en todos los casos se ignoraba la raza paterna de los embriones-fetos. Además, el tamaño del útero, el cual está correlacionado con la edad, raza y número de partos que haya tendido la hembra, influye sobre el crecimiento fetal de este período. También, se debe considerar el error humano en la medición de la muestra tomada inmediatamente posterior a su extracción del útero. Además, debemos recordar que la hembra bovina es unípara por lo cual fue dificultoso reunir un conjunto de fetos de igual edad y tamaño, hecho que se vería facilitado con especies politocas tales como las ratas, ratones o cobayos entre otras.

Sin embargo, la extracción de fetos a partir de animales de faena, con las limitantes que hemos señalado, constituyó una buena alternativa para utilizar la especie bovina u otras especies de interés productivo en estudios embrionarios-fetales. Esta opción presentó las ventajas de un bajo costo y la facilidad de obtención de las muestras frente a otras metodologías para obtener embriones o fetos, donde se debe tener un conocimiento certero de la fecha de servicio y recurrir a un aborto farmacológico o bien realizar un acto quirúrgico, ovariohisterectomía o cesárea dependiendo de la edad gestacional, para recuperar el embrión o el feto. En todos los casos y siguiendo el método aquí utilizado se obtuvo un material apropiado para estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos, sin alteraciones postmortem evidentes de los tejidos.

La técnica de IHQ utilizada resultó adecuada para los objetivos planteados referidos al estudio de la migración y posterior localización de las neuronas y fibras GnRH1 durante el desarrollo fetal y en los animales prepúberes bovinos. Los ejemplares más jóvenes donde se confirmó la presencia de elementos GnRH1-ir fueron fetos de 8 semanas de desarrollo. No se encontraron elementos GnRH1-ir en etapas previas, a pesar de implementarse variaciones en el tiempo de la incubación y la concentración del anticuerpo. Un dato sumamente controversial es la

ausencia de elementos GnRH-ir en los fetos de 9, 10- y 11 semanas de desarrollo donde no se encontró inmunomarcación con el anticuerpo LHR13. No se puede descartar que este hecho pudiera obedecer a errores involuntarios en la técnica. Por otro lado, Caldani y col. (81) en los estudios realizados sobre la migración y desarrollo del sistema GnRH en los ovinos obtuvieron resultados dispares en cuanto a la edad inicial de inmunomarcación utilizando diferentes materiales (incorporación de tritón X en las soluciones tampones y diferentes tipos de anticuerpos) o distintas metodologías (secciones en parafina, secciones por congelación de tejido fresco o de tejido formolado). Estos autores confirmaron la presencia de elementos GnRH-ir entre los 36-52 días de desarrollo (118). De la misma forma que en esta investigación, Caldani y col. informaron que no siempre fue posible observar los elementos GnRH-ir hasta los 80 días, o mayor edad, del desarrollo fetal de los ovinos (118).

Si bien existen numerosos trabajos, en diversas especies animales, sobre la migración de las neuronas GnRH, en la mayoría de ellos se constata la falta de una serie secuencial consecutiva y completa del desarrollo. Por lo tanto, existe una ausencia u omisión de resultados en períodos específicos de la vida prenatal (109, 113, 126, 197, 208-213, 227, 228, 230-234).

Tal vez, esta situación sea debida a la dificultad en el hallazgo de fetos de una determinada edad o bien por el mismo hecho que se confirmó en este estudio, la ausencia de elementos GnRH-ir en determinados períodos del desarrollo.

Al igual que en el ovino, en el bovino existiría un período fetal comprendido entre la 9<sup>a</sup> y la 11<sup>a</sup> semana del desarrollo donde no sería posible identificar siempre elementos GnRH por la técnica IHQ. No sería un dato novedoso que poblaciones neuronales durante determinados períodos expresen temporalmente moléculas que nunca volverán a expresar en su ciclo vital. El ejemplo más elocuente es la expresión de la enzima colina-acetil transferasa en los primeros días de la vida de una neurona (261, 262). Sin embargo, no encontramos argumentos

para explicar la falta de elementos GnRH-ir durante el período del desarrollo citado, en especial porque dichos elementos reaparecen tres semanas después como cuerpos neuronales y fibras GnRH-ir en distintos sectores del hipotálamo fetal.

La presencia de células GnRH-ir localizados fuera de la región hipotalámica o del encéfalo ha sido citada por diversos trabajos en distintas especies (35, 38, 72-80, 82-92, 95). Uno de los lugares de hallazgos más interesantes de estas células GnRH1-ir fue en la epidermis de la región fronto-nasal de los fetos ovinos (81). En el presente trabajo se corrobora la presencia de células inmunorreactivas en la epidermis de la región fronto-nasal y de la región rostral de la nariz en fetos bovinos de 8 semanas de desarrollo con una morfología y tamaño similar a lo señalado por Caldani y col (1988) (81). Sin embargo, estas células bipolares o estrelladas aparecen también en las secciones testigo incubadas sin el anticuerpo LHR13, por lo que sería lógico sugerir que se trataron de células que reaccionaron inespecíficamente a la IHQ con el sistema peroxidasa-antiperoxidasa. De forma que estas células fueron consideradas como peroxidasa-DAB+ y no GnRH-ir, demostrando una vez más, la importancia de implementar secciones testigos. Estas células, tanto por morfología como por ubicación, fueron similares a las citadas por Caldani y col. (1988) como células GnRH-ir (81).

En la mayoría de las especies de vertebrados estudiadas se expresaron al menos dos variantes moleculares de GnRH (15, 31-37, 63-67, 70, 71, 231). En los mamíferos, la presencia de variantes moleculares de GnRH informadas tiene grandes diferencias entre los distintos órdenes y aun entre los distintos grupos taxonómicos. En los mamíferos euterios el número de variantes moleculares halladas varió entre una y tres. Por ejemplo en los marsupiales y mamíferos insectívoros (63-66) se han identificado las variantes GnRH1 (mGnRH) y GnRH2 (cIIGnRH), mientras que en el bovino solamente obtuvimos inmunomarcaciones para GnRH1.

La GnRH1 es una variedad molecular constante en todos los animales euterios, presentándose además GnRH2 (cIIGnRH) en el humano, los simios, el carpincho y las musarañas (69-71, 231). Sin embargo, la presencia de GnRH2 (cIIGnRH) se encontró también citada en roedores como la rata y el ratón (41, 54, 67) donde se informó la presencia de cuerpos celulares GnRH2 localizados preferentemente en el cerebro medio, y muy pocos de ellos en la región hipotalámica (41). En estas dos especies aparecen escasas fibras GnRH2 en las inmediaciones de la eminencia media (54). Sin embargo, es contradictorio el hallazgo de la ausencia del gen que codifica la forma prepro-GnRH2 en ratones y ratas (69), por lo cual sería necesario una reevaluación de los datos existentes para IHQ con los distintos anticuerpos policlonales contra GnRH2 en los animales de laboratorio. Para el caso de los rumiantes domésticos se ha detectado una sola forma molecular del neuropéptido, GnRH1 (mGnRH). Sin embargo, en los bovinos se ha informado la presencia de una segunda forma molecular, sGnRH (67) similar a la citada para el carpincho (70, 71). A esta situación debemos agregar la información genética aportada por Morgan and Millar (2004) (69) que identificaron en los bovinos los genes que codifican al decapeptido GnRH2 (cIIGnRH) y a su receptor. Estos mismos autores basados en pruebas de activación de los receptores sugirieron que el decapeptido GnRH2 posee una modificación estructural, pues el AA triptofano en la posición tres es reemplazado por el AA arginina. Este hecho no modificó la afinidad por los receptores GnRH1 y GnRH2 pero inhibió la capacidad para activar el receptor GnRH2, con la consecuente posibilidad de que esta hormona actué como modulador o antagonista de GnRH1. Lamentablemente, la presencia de receptores GnRH2 (cIIGnRH) no fue detectada en el tejido hipofisiario de los bovinos (68). Por lo tanto, si bien se han hallado los genes que codifican a la molécula y el receptor de GnRH2 en el bovino, al no existir evidencia de la presencia de la molécula, ni de su receptor

sería probable que las funciones de la misma estén completamente reemplazadas por el sistema GnRH1 en el bovino (69).

En las secciones provenientes de fetos y bovinos prepúberes de la presente investigación, no se ha evidenciado elementos GnRH2-ir. Sin embargo, cerebros de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), cedidos gentilmente por el Dr Gustavo Somoza, procesados en paralelo con la misma técnica (datos no mostrados) se observaron elementos GnRH2-ir en los sectores encefálicos citados en las correspondientes referencias (263) evidenciando la eficiencia del anticuerpo y la metodología aplicada.

Lamentablemente son muy escasos los trabajos realizados con variantes moleculares de GnRH en rumiantes domésticos. Yahalon y col. (1999) (67) coinciden con los datos aquí expresados, ya que no encontraron GnRH2 en los extractos de hipotálamo. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo permitirían descartar al anticuerpo policlonal cII675 y la utilización de la IHQ como una técnica apropiada para la búsqueda de la variante molecular GnRH2 en bovinos. También sería posible que la variación estructural de la GnRH2 bovina (69) no sea reconocida por el anticuerpo utilizado. De todas formas, la controversia sobre la presencia de GnRH2 se encuentra aún en especies tan estudiadas como la rata, ya que informaciones recientes han refutado la idea de la ausencia de esta variante en esta especie de roedores (264). Probablemente, el uso de distintos métodos permitirá confirmar que la GnRH2 es la variante molecular más conservada desde los peces hasta los mamíferos, tal como se propuso originalmente.

## **5.2. La cantidad de células GnRH-ir en las distintas semanas del desarrollo**

El número de somas GnRH-ir estimado para los fetos y bovinos prepúberes fue de 1554 a 2471, lo cual evidencia que se trató de una población neuronal pequeña que no varió sustancialmente con la edad del individuo y que fue muy similar que en otras especies de animales estudiados (81, 106-110, 115, 116, 118, 120-123, 125-128).

La cantidad de neuronas GnRH-ir estimadas para el bovino (fetos y prepúberes) fue similar al número encontrado en otros rumiantes (ovinos y caprinos) sean estos fetos o adultos (81, 107, 121). Por otro lado, al menos un artículo informó un dimorfismo en la cantidad de neuronas GnRH-ir, ya que los machos caprinos adultos tenían el doble de somas celulares que las hembras caprinas (107, 121). Sin embargo, en las citas bibliográficas no se encuentra especificado si el sacrificio de los animales, hembras y machos, se realizó en el mismo momento o al menos en la misma época, ya que al ser esta especie poliéstrica estacional con fotoperíodo negativo, la variación cuantitativa de neuronas GnRH-ir pudo haber sido por la estacionalidad reproductiva propia de la especie (124, 127). De todas formas, existen datos publicados contradictorios pues, en otras especies poliéstricas estacionales incluidos los ovinos, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de neuronas GnRH-ir acorde a la época reproductiva (128, 130, 138). Si bien, no se encontraba dentro de los objetivos discernir si existía diferencia en el número de neuronas GnRH-ir en el sexo, se pudo haber esperado un incremento en el número de somas GnRH-ir en los terneros por este motivo, descartándose el factor estacionalidad al ser el bovino una especie poliéstrica continua.

El número estimado de células GnRH-ir del bovino fue claramente mayor que en los roedores (109, 120, 122, 126, 127) y en los porcinos (115), y similar al de los primates (106, 133).

La información existente sobre la posible variación en el número de neuronas GnRH-ir durante las diferentes etapas del desarrollo de un individuo es discordante entre los diferentes autores (106, 108-110, 118, 126). Los resultados obtenidos en las diferentes etapas del desarrollo fetal estudiadas y en los animales prepúberes bovinos fueron coincidentes a lo expresado por Wray (1989 y 1994) (109, 110) y Tobet, (153) quienes no observaron una variación significativa del número de neuronas entre las diferentes etapas del desarrollo de un individuo. Por otra parte, Duittoz et al (1997) (106) contabilizaron un mayor número de células durante la etapa embrionaria y fetal de los ovinos con respecto a los adultos (81, 118). Sin embargo, la metodología utilizada por ambos autores en estos estudios fue diferente, ya que en una se realizó el conteo de células GnRH-ir a partir de cultivos celulares de la placoda olfativa (106) y en la otra, el conteo se realizó a partir de cortes histológicos.

### **5.3. La morfología de las células GnRH-ir durante el desarrollo.**

Las referencias existentes sobre los parámetros morfométricos de las células GnRH-ir en las etapas embrionaria y fetal fueron escasas. Sólo hemos encontrado algunos trabajos que miden los somas GnRH-ir en la especie ovina (81, 106, 118) y en seres humanos (111).

La morfología de los somas de las células GnRH-ir observada en esta investigación fue coincidente con las descripciones realizadas por Duittoz (1997) (106) y por lo tanto fue factible utilizar la clasificación propuesta por este autor, aun cuando sus resultados provienen de cultivos celulares de la placoda olfativa de embriones ovinos (106). En las secciones estudiadas se pudieron distinguir los tipos de células neuroblásticas, células en migración y en red, tanto bipolares como multipolares (106). Sin embargo, la la cantidad absoluta y relativa de los tipos de células GnRH-ir citados varió considerablemente en las diferentes edades del

desarrollo de los bovinos. De la misma forma las dimensiones de estas células tuvieron diferencias significativas de acuerdo a la edad del individuo.

Las células tipo neuroblásticas GnRH-ir (NGB), sólo identificadas en la cavidad nasal de los fetos bovinos de 8 semanas de desarrollo, tuvieron un tamaño mayor ( $15,7\pm 2,19\mu\text{m}$ ) con respecto a las células del mismo tipo ( $5,72\pm 0,2\mu\text{m}$ ) descritas en los ovinos (106). Por otro lado, no existieron referencias del tamaño de este tipo celular en otras especies animales.

Las neuronas GnRH-ir en proceso de migración durante la 8<sup>va</sup> semana de desarrollo fueron de aspecto fusiforme con dos prolongaciones que parten desde los polos del soma (bipolar). El eje mayor de estas neuronas migratorias varió significativamente según su localización, así las de mayor longitud (NGCNa:  $27,73\pm 7,91\mu\text{m}$ ) se encontraron en distintas regiones de la cavidad nasal asociadas a los filetes del nervio vomeronasal. Le siguen en longitud las que se encontraron sobre el nervio terminal (NGNT:  $20\pm 4,87\mu\text{m}$ ), mientras que las neuronas más cortas se encontraron en el interior del encéfalo (NGE:  $17,93\pm 4,27\mu\text{m}$ ). Estos datos, sólo pueden compararse con los citados por Duitoz (1997) (106) a partir de cultivos celulares de la placoda olfativa de ovinos que describe neuronas GnRH-ir en migración con una longitud (eje mayor) de  $14,96\pm 0,84\mu\text{m}$ .

Los resultados obtenidos de los diferentes parámetros morfométricos de las células GnRH-ir en fetos bovinos de 8 semanas fueron indicativos de un manifiesto cambio del tamaño y del aspecto celular durante la migración. Las neuronas bipolares GnRH-ir en proceso de migración dentro de la cavidad nasal fueron los elementos de mayor tamaño. Todos los parámetros evaluados: superficie, perímetro, ejes e índice de redondez, fueron mayores en comparación con los estimados para los otros tipos de células GnRH-ir identificados en esta etapa del desarrollo.



Las neuronas GnRh-ir a medida que abandonaban la cavidad nasal a través del pasaje del nervio terminal y vomeronasal disminuyeron progresivamente el tamaño del soma celular. De manera que en la intersección naso-encefálica fueron de un tamaño medio y finalmente midieron aun menos en el interior del prosencéfalo secundario. Estos cambios en el tamaño de las células GnRH-ir posiblemente resultaron de la interacción de diversas sustancias intra y extracelulares asociadas al proceso de migración, y posibilitan el traslado y el pasaje de las mismas por los diferentes lugares anatómicos hasta su ubicación final en el hipotálamo.

Las neuronas GnRH-ir denominadas “en red” (106), sean estas bipolares o multipolares, fueron halladas en las diferentes edades fetales y en los animales prepúberes bovinos. A partir de la 12<sup>da</sup> semana de gestación hasta el período prepuberal se evidenciaron diferentes tipos morfológicos de células GnRH-ir que en un principio podrían clasificarse en: de sección circular, fusiforme y bipolar, fusiforme y unipolar, fusiforme en “T” y multipolar. Sin embargo, las células de sección circular fueron consideradas como cortes transversales de neuronas fusiformes bipolares, mientras que para las células fusiformes unipolares se consideró que la ausencia de una de las prolongaciones puede obedecer al plano de sección de la célula (112, 114, 115, 121). En síntesis, para el bovino en los períodos fetales a partir de la 12 semana hasta el período prepuberal, las neuronas GnRH-ir observadas se pudieron clasificar en dos tipos básicos: un tipo fusiforme y bipolar, en el cual se podría considerar un subtipo con prolongación en “T”, y otro multipolar. Ambos tipos celulares GnRH-ir fueron descritos durante la etapa fetal en ovinos (118) y en adultos de diversas especies (105, 111, 112, 114-117, 119-121). Por el contrario, la presencia de neuronas GnRH-ir multipolares no fue citada en embriones de *Rhesus macaques* (113) y en fetos humanos (111), mientras que el subtipo bipolar con prolongación en “T” solamente aparece descrito en fetos porcinos (115).

El tipo de neurona GnRH-ir predominante en el bovino fue una célula fusiforme y bipolar. Aproximadamente el 98% de las neuronas identificadas correspondieron a este tipo y no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de las mismas, tanto en fetos de más de 12 semanas como en animales prepúberes. Sin embargo, en fetos de la 8<sup>va</sup> semana de desarrollo no se observa ninguna célula GnRH-ir de tipo multipolar.

Las neuronas GnRH-ir bipolares se caracterizaron por tener largas prolongaciones y en una de ellas se observó una dilatación cercana al polo somático coincidente a la descripción realizada por Leshin y col para el bovino (114), así como la realizada en otros ruminantes (105, 121). Sin embargo, un escaso número de células GnRH-ir bipolares tuvo en uno de sus extremos una corta prolongación que cercana al polo somático se bifurcó en forma comparable a la letra “T”. La población de este subtipo de neurona GnRH-ir bipolar representó sólo el  $0,57 \pm 0,17\%$ .

El tamaño de las neuronas GnRH-ir fetales del bovino ( $20 \times 9 \mu\text{m}$ ) fue menor que aquel citado para los humanos ( $28 \times 9 \mu\text{m}$ ). Sin embargo, el tamaño de las neuronas GnRH-ir fetales como las prepuberales bovinas se situó en un rango de tamaño similar (12 a  $27 \mu\text{m}$ ) al de animales adultos de otras especies, tales como (117) humano (111) coipo (120), bovinos (114), porcinos (115), ovino (105) y caprinos (121); a excepción de las neuronas GnRH-ir bipolares del hurón que fueron de un tamaño mayor (265).

Es llamativo el hecho que las neuronas GnRH-ir bipolares de la cavidad nasal a la 8<sup>va</sup> semana del desarrollo fueron grandes y se redujeron de tamaño al ingresar en el encéfalo. Sin embargo, se produjo un incremento del tamaño de las neuronas GnRH-ir una vez ubicadas en el hipotálamo. De manera que todos los parámetros morfométricos evaluados en las neuronas GnRH-ir de bovinos prepuberales fueron mayores a los obtenidos en fetos de 12-22<sup>da</sup> semana del desarrollo. Además, no se constataron diferencias significativas en el tamaño neuronal

entre las 16-18 semanas y 21-22 semanas del desarrollo. Este incremento en el tamaño celular entre las neuronas GnRH-ir y animales adultos también fue observado en la especie ovina (105). Sin embargo, no hubo diferencias en el índice de redondez de las neuronas GnRH-ir de las distintas edades fetales entre sí y con los animales bovinos prepúberes, por lo cual, la forma de las neuronas GnRH-ir no varió durante estas etapas.

La población de neuronas GnRH-ir multipolares representó el  $1,26 \pm 0,3\%$  y no se observaron diferencias significativas en la cantidad de neuronas de este tipo celular entre los fetos y los animales prepúberes. La escasa cantidad de neuronas multipolares en fetos y animales prepúberes bovinos sería coincidente con el número de este tipo neuronal hallado en bovinos adultos (114) y en otras especies (105, 112, 119, 121) pero contrasta con lo enunciado por algunos autores quienes encontraron una mayor proporción de neuronas GnRH-ir multipolar, aproximadamente el 10% (115), o bien informaron la ausencia de este tipo de células (116, 120) o simplemente las consideraron como un subtipo celular en animales adultos (111, 113, 118, 119). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos revisados que mencionan la presencia de neuronas GnRH-ir multipolares no se expresaron cantidades o porcentajes de este tipo celular (105, 112, 119). La presencia y cantidad de neuronas GnRH-ir multipolares parecería estar en relación con el orden y más específicamente con el grupo taxonómico a que pertenece la especie animal. Las neuronas GnRH-ir multipolares se han citado en las tres especies de rumiantes domésticos (105, 114, 121). Sin embargo, no se citan en los roedores (116, 120) y en los carnívoros (112, 117).

Las neuronas GnRH-ir multipolares fueron observadas en el área septal, el área preóptica y el área hipotalámica anterior de la región hipotalámica tanto en fetos como en animales prepúberes bovinos coincidiendo mayoritariamente con lo informado para los rumiantes adultos (105, 114, 121). Su presencia pudo estar asociada a las conexiones de las neuronas

GnRH entre si. La existencia de este tipo de neuronas incrementaría la posibilidad de sinapsis GnRH en neuronas GnRH, de forma que esta población pueda actuar como un sincitio funcional en el momento de liberar en conjunto el péptido regulador (266).

#### **5.4. La migración de las neuronas GnRH-ir durante el desarrollo prenatal**

Hasta el presente, no existen publicaciones que describan la migración de las neuronas GnRH en la especie bovina. Durante la 8<sup>va</sup> del desarrollo fetal, donde se observó la migración de las neuronas GnRH-ir a través de la cavidad nasal y del prosencéfalo secundario no se observó una correlación entre la edad en días y la ubicación anatómica de las neuronas GnRHir. Sin embargo, dentro de este momento del desarrollo, se constató en todos los casos que cada feto posee proporciones diferentes de células GnRHir de tipo neuroblástica y de tipo bipolares en migración dentro de la cavidad nasal, en la intersección naso-encefálica y en el prosencéfalo coincidiendo con lo observado por diversos autores (82, 109-111, 114, 119, 127, 208-214, 228, 231, 232).

Las diferentes distribuciones y proporciones de los distintos tipos celulares GnRH-ir identificados en cada feto bovino de 8<sup>va</sup> semana de desarrollo sugieren que la migración naso-encefálica fue un proceso rápido en el tiempo y ocurre principalmente entre los 52-60 días del desarrollo fetal. Este hecho fue similar a lo que acontece en diversas especies animales, tales como: ovinos (82, 119), ratón (81, 109, 113, 126, 208-210, 212, 227), rata (208, 228), cobayo (212, 214) y primates (109, 111) a excepción del humano (230, 232).

Durante la diferenciación de los distintos componentes que forman el primer arco branquial, la placoda olfatoria se invagina en dos oportunidades. La primera invaginación acompaña el desarrollo de la cavidad nasal y desplaza la placoda que profundiza en el interior de la cavidad. La segunda invaginación, menos pronunciada, corresponde a la formación de un

receso medial. A partir del proceso de invaginación principal se origina el sistema olfatorio principal y del segundo proceso se origina el órgano vomeronasal. A medida que se internalizan los elementos que acompañan a la invaginación se desarrollan en forma paralela los etmoturbinados del hueso etmoides (25, 118, 151, 176-184).

La mayor parte de la población de células tipo NGB se localizó en la zona de unión del tercio rostral con el tercio medio de la mucosa de la cavidad nasal. Las células GnRH-ir de aspecto redondeado se observaron intercaladas entre las células del epitelio nasal y en la mucosa del órgano vomeronasal de los fetos bovinos coincidiendo con lo observado en ratones donde los primeros somas celulares GnRH-ir fueron observados en el epitelio de la parte medial de la placoda olfativa, sector que incluye el primordio del órgano vomeronasal (109, 126, 208-210, 212). Esta distribución de la población NGB en los fetos bovinos sugirió que las células GnRH-ir principalmente tendrían su origen en la parte medial de la placoda olfativa la cual da origen a la invaginación secundaria como una parte de la invaginación principal.

Las poblaciones de células NGCNa y fibras GnRH-ir se hallaron principalmente en los planos sagitales adyacentes al plano medio de la cabeza, cercanos al septo nasal y se distribuyeron tanto en su porción dorsal, media y ventral como en las porciones cefálica, media y caudal de la cavidad nasal. Las NGCNa parecieron seguir un trayecto predeterminado acompañando los nervios vomeronasales, en forma paralela a los vasos sanguíneos y coincidente con lo observado en ovinos (82, 119), ratón (81, 109, 113, 126, 208-210, 212, 227), rata (208, 228), cobayo (212, 214) y primates (109, 111).

Por la posición y situación de las células NGCNa y las fibras GnRH-ir en la cavidad nasal, se pudieron describir tres rutas a lo largo de la cavidad nasal con distinta densidad de neuronas y de fibras, y en relación con el epitelio olfatorio o el órgano vomeronasal. En su conjunto, estas rutas de migración semejaban un triángulo cuya base estaba orientada hacia la abertura

rostral de la cavidad nasal y su vértice se ubicaba en la intersección naso-encefálica. Las neuronas GnRH-ir migraban por distintas rutas contenidas en el interior de este triángulo, se juntaban en una sola ruta migratoria sobre el nervio terminal, atravesaban la lámina cribada del hueso etmoides en dirección caudo-dorsal y finalmente penetraban en el tejido nervioso en la intersección naso-encefálica.

La mayor cantidad de células GnRHir se observó en la ruta de migración más ventral, que formó la hipotenusa del imaginario triángulo descrito. Esta línea une el órgano vomeronasal con la intersección naso-encefálica, por lo cual, sería probable que la mucosa que recubre este órgano, represente el principal productor de células GnRH-ir en esta etapa del desarrollo.

La migración de las neuronas GnRH-ir sobre las fibras de los nervios vomeronasales y sobre el nervio terminal ha sido reconocida por diferentes autores (81, 109, 113, 118, 126, 208-210, 227, 230, 232). Sin embargo, la ruta migratoria observada en dorsal de la cavidad nasal, paralela a la superficie de la cara interna del hueso etmoturbinado I pareciese que está mejor definida en los fetos bovinos cuando se compara con lo informado por distintos autores en ovinos (82, 118, 119), ratón (81, 109, 113, 126, 208-210, 212, 227), rata (208, 228), cobayo (212, 214), primates (109, 111, 230-232).

En la intersección naso-encefálica, se observó la presencia agrupadas y concentradas de neuronas bipolares y fibras GnRH-ir sobre el pasaje del nervio terminal y los nervios vomeronasales tal como es reconocida por diversos autores para otros mamíferos como los ovinos (82, 119), los ratones (81, 109, 113, 126, 208-210, 212, 227), las ratas (208, 228), los cobayos (212, 214) y los primates (109, 111). En esta región de los fetos bovinos de 8<sup>va</sup> semana de desarrollo se observó que la cantidad de somas neuronales GnRH-ir no varió sustancialmente (10 al 15% del total de neuronas GnRHir) entre los diferentes individuos procesados.

La intersección naso-encefálica ha sido considerada como un punto crítico en el proceso de migración. Varios autores sostienen que en este sitio se produce una pausa temporal o un enlentecimiento de las células GnRHir justo antes de penetrar en el encéfalo (237, 238, 249-251). Esta teoría se sustentaría en la idea que la demora migratoria posibilita que los axones del nervio terminal y vomeronasal se alarguen y curven hacia las regiones del hipotálamo en formación. Debido a que estos nervios fueron identificados como las principales guías para el desplazamiento de estas células sería lógico inferir que ellos deben completar primero su distribución para continuar siendo los rieles del proceso (250). Sin embargo, otros investigadores reconocieron la pausa como un momento necesario para la maduración de las neuronas GnRH (249) justo antes de la entrada en el encéfalo (250). Además de la interacción de los diversos factores y sustancias involucrados en la migración de las neuronas GnRH-ir por esta región (237, 238, 249, 250), no puede descartarse que la intersección naso-encefálica sea un pasaje estrecho que puede interferir la migración de las neuronas GnRH-ir por factores exclusivamente anatómicos.

Las neuronas y fibras GnRH-ir se encontraron en diferentes proporciones en los encéfalos de los fetos bovinos de la 8<sup>va</sup> semana de edad gestacional. En principio se orientaban dorso cranealmente para luego tomar dirección hacia caudal describiendo, un trayecto en “U” por ventral y caudal del bulbo olfatorio. Las fibras y neuronas GnRH-ir en el interior del prosencéfalo prosiguieron su trayecto sobre el nervio terminal y vomeronasal, se dirigieron hacia dorsal y caudal para posteriormente descender y colonizar principalmente los territorios presuntivos del área septal y el área preóptica del hipotálamo. Esta primera localización encefálica de las neuronas GnRH-ir que se identificó en los fetos bovinos de la 8<sup>va</sup> semana de desarrollo coincidió con lo observado por otros autores en otras otras especies como. los

ovinos (82, 119), los ratones (81, 109, 113, 126, 208-210, 212, 227), las ratas (208, 228), los cobayos (212, 214) y los primates (109, 111).

### **5.5. Distribución encefálica de las neuronas y fibras GnRH-ir**

En los bovinos solamente existen referencias descriptivas sobre la distribución de la neuronas y fibras GnRH-ir en las principales áreas y núcleos de la región hipotalámica de animales adultos sin que haya una cuantificación de los somas neuronales en cada uno de ellos (114, 136).

En los cortes coronales de los fetos bovinos de la 12<sup>da</sup> semana de desarrollo no se observaron cuerpos celulares GnRH-ir en ningún sector de la cavidad nasal, en la intersección naso-encefálica o en los bulbos olfativos del cerebro por lo cual se podría considerar que la migración nasal ha culminado para este momento del desarrollo. En esta edad, las áreas hipotalámicas y del tálamo ventral se observaron con un avanzado estado de desarrollo al igual que en las regiones vecinas (núcleos del cuerpo estriado y complejo nuclear del tálamo), donde era posible identificar algunos núcleos y áreas hipotalámicas y a las neuronas y fibras GnRH-ir. En general, en la 12<sup>da</sup> semana de desarrollo, la población neuronal en estudio tenía una ubicación y distribución similar al de un animal adulto (114, 136) y se identificó el área preóptica, el área septal, el área hipotalámica anterior y el núcleo supraóptico como las regiones de mayor concentración de somas GnRHir.

Sin embargo, estas observaciones no nos permitirían aseverar que la migración de las neuronas GnRH ha culminado en el interior del encéfalo. Existieron algunos hallazgos que permitirían suponer que aun existen cambios de localización celular sin modificación del número total de somas GnRH-ir. En primer lugar, a la 12<sup>da</sup> semana de desarrollo se observó una mayor cantidad de somas y fibras GnRH-ir en la proyección rostral del sistema GnRH



(cápsula interna, tubérculo olfatorio, núcleo acubens, núcleo caudado y áreas vecinas) con respecto a los fetos de mayor edad gestacional y animales prepúberes. Este hecho sugirió que existen elementos de la población que aun se encontrarían en proceso de migración desde una localización más rostral (unión septo preóptica) hacia los núcleos del hipotálamo. En segundo término, se apreció la presencia de las neuronas GnRH-ir en áreas no descritas en los rumiantes adultos o bien en donde fueron encontradas en una cantidad considerablemente menor (81, 105, 121, 130, 138) incluido el bovino (114, 136). La tercer observación a señalar se evidenció en la proyección caudal del sistema GnRH de los fetos de esta edad de desarrollo gestacional. En el núcleo arcuato y región periarcuata se identificó una menor cantidad de neuronas GnRHir con respecto a los fetos de mayor edad gestacional, animales prepúberes y a lo citado para los rumiantes adultos (81, 105, 114, 121, 130, 136, 138). En cuarto lugar se observó un área de alta concentración de somas GnRH-ir caudales al área preóptica las que no pudieron ser ubicados dentro de un área o núcleo definido, sino en una zona triangular con baja densidad celular que quedó comprendida hacia lateral del tercer ventrículo y el núcleo arcuato. Esta zona comprendida entre el área hipotalámica anterior por dorsal y el núcleo supraóptico junto al tracto óptico por ventro-lateral tuvo una alta densidad de neuronas GnRH-ir con una orientación diferente al resto de la población, ya que sus prolongaciones estaban alineadas con una dirección dorso-medial. La última observación que sugirió movimiento y reorganización del sistema GnRH en este período del desarrollo fue la presencia de fibras GnRH-ir con una dirección prácticamente perpendicular al fascículo principal ventro-lateral. Estas fibras también aparecieron en el triángulo citado previamente y ocupado por numerosas neuronas GnRH-ir. Estas fibras se proyectaban hacia el AHA, partiendo de las neuronas GnRH-ir que tenían esa misma orientación. Estas cinco observaciones, sumadas a la presencia estable del mismo número de neuronas GnRH-ir en el

período anterior (8<sup>va</sup> semana) y posterior (16-18<sup>va</sup> semana) sugirieron que esta población neuronal no sufrió importantes procesos apoptóticos, pero se encontraría en movimiento desde sectores rostrales hacia sectores más caudales del hipotálamo.

En los cortes coronales de los fetos bovinos de 16-18<sup>va</sup> semana de desarrollo el patrón de distribución de los somas GnRHir fue similar al encontrado en la categoría etaria anterior. Sin embargo, se observó: *a)* una disminución de la cantidad de somas GnRHir extrahipotálamicos en la extensión rostral de la población, las que se ubicaron en el núcleo acumbens y tubérculo olfatorio *b)* una disminución de la cantidad de somas GnRHir en el área de baja densidad ubicada entre el núcleo supraóptico, el área hipotalámica anterior y el núcleo arcuato. *c)* presencia de escasas fibras GnRH-ir con una dirección dorso-medial que fueron oblicuas y perpendiculares al fascículo principal. *d)* un incremento en el número de somas GnRHir en el núcleo arcuato y región periarcuata. En este período del desarrollo fetal, la ubicación y distribución de la población GnRH-ir tuvo similitud a lo descrito en los rumiantes adultos (81, 105, 114, 121, 130, 136, 138). Por lo tanto, el período comprendido entre las 16-18<sup>va</sup> semana del desarrollo correspondería a un importante momento de reorganización del sistema GnRH, aun cuando restarían algunos cambios menores en el proceso de migración dentro del hipotálamo.

La distribución de los somas y fibras GnRHir de los fetos de 21-22<sup>da</sup> semana de desarrollo y de los animales prepúberes tuvo una gran similitud y a su vez coincide con los resultados citados por otros investigadores para los rumiantes adultos (81, 105, 114, 121, 130, 136, 138). En los fetos de 21-22<sup>da</sup> semana de desarrollo se observó la ausencia de fibras GnRH-ir en el tubérculo olfatorio y el tracto olfatorio que se encontraban presentes hasta el período anterior. Estos resultados indicarían que los somas y fibras GnRHir se establecieron en su ubicación

definitiva a la mitad del período gestacional coincidiendo con lo expresado por Caldani (1995) para la especie ovina (118).

Uno de los temas controversiales en la distribución de los somas GnRH en las diferentes áreas y núcleos hipotalámicos de los rumiantes es la presencia y la cantidad de los mismos en el hipotálamo mediobasal (81, 105, 114, 121, 130, 136, 138). Los resultados obtenidos en los diferentes grupos etarios permitieron establecer que en el núcleo arcuato y región periarcuata se observó un porcentaje aproximado de 3-5% de somas GnRHir en los fetos mayores de 16 semanas de desarrollo y en los animales prepúberes. La presencia de estas neuronas en el hipotálamo mediobasal ha sido previamente citada en bovinos adultos (136), ovinos (81, 130) y caprinos (121). Sin embargo, Leshin y col (1998) (114) informaron la ausencia de somas neuronales GnRH-ir en el hipotálamo mediobasal de bovinos adultos. El número de somas GnRHir se incrementó significativamente en la región periarcuata y en el núcleo arcuato desde los fetos de la 12<sup>da</sup> semana de desarrollo fetal hasta los animales prepúberes. El número de somas GnRHir estimados fue similar a lo hallado en los bovinos adultos (136), algo menor con respecto a los caprinos (121), en relación con los ovinos fue similar a los datos aportados por Lehman y col (1986) (130) e inferior con respecto a los resultados de Caldani y col (1988) (81).

El estudio de la migración y de la distribución de los elementos GnRHir en conjunto permitió inferir algunos aspectos no detallados hasta el momento. En primer término, las neuronas GnRH no sufrirían una reducción apoptótica importante durante su migración nasal y encefálica. Por otro lado, si bien la migración a través de la cavidad nasal podría finalizar en la 8-9<sup>na</sup> semana del desarrollo, no se puede tomar como concluyente pues no se han podido obtener datos (por ensayo o por citas bibliográfica) de los sucesos que podrían suceder en las 9-11<sup>ta</sup> semana de desarrollo. Por último, el período comprendido entre la 12-16<sup>ta</sup>

semana representó una ventana temporal donde la población de somas y fibras GnRH aun estaba reorganizándose y probablemente sea sensible a cualquier tipo de sustancias que interfieran con este proceso.

## **5.6. Nomenclatura de las moléculas de GnRH**

La nomenclatura para identificar las diferentes formas moleculares a partir de la especie donde fue aislada ha traído confusiones en la denominación de las diferentes variantes moleculares de GnRH por lo que se propuso un reordenamiento del nomenclador para las isoformas de GnRH. Fernald, RD y White, R.B. (1999) (24) propusieron un nomenclador basado en la función, localización cerebral y algunos aspectos filogenéticos de la molécula de GnRH, sin tomar en consideración las secuencias de aminoácidos y nucleótidos. Las diferentes variantes naturales de GnRH fueron agrupadas en tres grupos: GnRH 1, GnRH 2 y GnRH 3. Sin embargo, esta nomenclatura no puede distinguir entre las diferentes formas encontradas en el hipotálamo de distintas especies. Por ejemplo, mGnRH, sbGnRH, cfGnRH, hrGnRH, wfGnRH, y pjGnRH pueden ser nombradas con la misma terminología: GnRH1. Además, en el caso de los salmónidos, sGnRH puede estar nombrada tanto como GnRH3 o como GnRH1 dependiendo de su localización neuroanatómica (27). Dubois y col (2002) (30) propusieron una nueva nomenclatura. En este caso, la cGnRHIII por su localización neuroanatómica en el mesencéfalo la denominó MB-GnRH, las formas de GnRH hipofisiotróficas específicas de especies fueron denominadas VF-GnRH y por último como TN-GnRH se designa a sGnRH tanto en el ganglio como en el nervio terminal. La presente terminología tendría problemas similares para nombrar las variantes moleculares de GnRH que la propuesta por Fernald, RD y White, R.B. (1999) (24). También debemos tener en cuenta que en los embriones y fetos mamíferos las neuronas GnRH (mGnRH) migran a través

del nervio terminal, lo cual daría a confusión si se denominara como GnRH3 a mGnRH o bien no podría nombrarse como GnRH1 a la totalidad de las neuronas GnRH-ir durante la migración nasal y por el nervio terminal por su localización en ese momento del desarrollo. La clasificación propuesta por Dubois y col (2002) (30) solamente abarca al sistema GnRH encefálico sin considerar los diferentes hallazgos de GnRH fuera del encéfalo. También, los hallazgos de Morgan y col (68), quienes enunciaron una posible estructura química diferente para chGnRHIII en el bovino, molécula que en su secuencia de AA fue idéntica en todas las especies donde fue hallada, tendría que diferenciarse de alguna manera. Si bien la clasificación propuesta por Fernald, RD y White, R.B. (1999) (24) sea de las más abarcativas y usadas, el agregado de un subfijo a la denominación que indique la especie y lugar de acción podría aclarar algunos aspectos de la molécula de que se trata. Igualmente, en la medida que se tenga un mayor conocimiento de estas moléculas, sus diferentes localizaciones y sus funciones se podrá estructurar un nomenclador definitivo.

## 6. CONCLUSIONES

- Los métodos utilizados y el uso del anticuerpo monoclonal LRH13 para el procesamiento inmunohistoquímico de secciones provenientes de fetos de distintas edades y terneros resultaron eficientes para evidenciar las células GnRH que sintetizan y almacenan la variedad mamífera del decapeptido durante parte del período de migración y finalizado este proceso.
- Los métodos utilizados y el uso del anticuerpo policlonal CII 675 para el procesamiento inmunohistoquímico de secciones provenientes de fetos de distintas edades y terneros no pudieron detectar la presencia de elementos inmunorreactivos, por lo cual se sugiere que no existirían células que sinteticen la variedad chGnRHII (GnRH2) en el hipotálamo de fetos y bovinos prepúberes.
- Hasta los 49 días de gestación no aparecen elementos GnRH-ir y durante la 8<sup>va</sup> semana se observa los elementos GnRH-ir en proceso de migración dentro de la cavidad nasal y en el prosencéfalo secundario.
- Por la posición y situación de las células y las fibras GnRH-ir en la cavidad nasal, es posible describir tres rutas migratorias principales a lo largo de la cavidad nasal, todas ellas en relación con axones de los nervios vomeronasal y terminal, así como con vasos sanguíneos. Las células GnRH-ir se encuentran siempre en relación con el epitelio que tapiza el tabique nasal o el órgano vomeronasal, convergen hacia la lámina cribada del hueso etmoides y finalmente se juntan en una sola ruta migratoria sobre el nervio terminal. Luego penetran en el tejido encefálico a través del meato dorsal de la intersección naso-encefálica.

- La intersección naso-encefálica podría ser un punto crítico en el proceso de migración de las neuronas GnRH-ir no solo por factores moleculares sino también por factores anatómicos.
- La cantidad de neuronas GnRH-ir estimadas para los fetos y los animales prepúberes no tuvo diferencias significativas, de manera que la población GnRH desde la 8<sup>va</sup> semana del desarrollo no sufriría reducciones por procesos apoptóticos, tal como se describe para otras poblaciones neuronales.
- Los parámetros morfométricos de las células GnRH-ir varían ampliamente de acuerdo a su ubicación anatómica. Este hecho debe comprenderse como una modificación del tamaño y la forma celular a consecuencia del proceso de migración a través de la cavidad nasal y del tejido nervioso.
- Las neuronas GnRH-ir del bovino alcanzan su distribución y localización definitiva, al igual que en otras especies de rumiantes, en la mitad del período de gestación.
- Las células reactivas identificadas en la epidermis de la región fronto-nasal de los fetos bovinos reaccionan inespecíficamente a la inmunohistoquímica con el sistema peroxidasa-antiperoxidasa, por lo tanto no deben considerarse parte de la población GnRH.

### Bibliografia

1. Harris GW. Electrical stimulation of the hypothalamus and the mechanism of neural control of the adenohipophysis. *J Physiol*. 1948 Sep 30;107(4):418-29.
2. Harris GW. Neural control of the pituitary gland. *Physiol Rev*. 1948 Apr;28(2):139-79.
3. McCann S. *Handbook of Physiology. Regulation of secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone*. American Physiological Society Washington; 1974.
4. McCann SM. Luteinizing-hormone-releasing hormone. *N Engl J Med*. 1977 Apr 7;296(14):797-802.
5. Conn PM, Crowley WF, Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med*. 1994;45:391-405.
6. Stojilkovic SS, Catt KJ. Novel aspects of GnRH-induced intracellular signaling and secretion in pituitary gonadotrophs. *J Neuroendocrinol*. 1995 Oct;7(10):739-57.
7. Emons G, Schally AV. The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum Reprod*. 1994 Jul;9(7):1364-79.
8. Hsueh AJ, Jones PB. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev*. 1981 Fall;2(4):437-61.



9. Kang SK, Choi KC, Yang HS, Leung PC. Potential role of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II in the ovary and ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2003 Jun;10(2):169-77.
10. Sherwood NM, Lovejoy DA, Coe IR. Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocr Rev*. 1993 Apr;14(2):241-54.
11. Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971 Jul 2;44(1):205-10.
12. Baba Y, Matsuo H, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971 Jul 16;44(2):459-63.
13. Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971 Jun 18;43(6):1334-9.
14. Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, et al. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972 Jan;69(1):278-82.
15. Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus:

evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Jun;81(12):3874-8.

16. Sherwood N, Eiden L, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 May;80(9):2794-8.

17. Guillemin R. Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *J Endocrinol*. 2005 Jan;184(1):11-28.

18. Pawson AJ, McNeilly AS. The pituitary effects of GnRH. *Anim Reprod Sci*. 2005 Aug;88(1-2):75-94.

19. Schneider F, Tomek W, Grundker C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: a review. *Theriogenology*. 2006 Sep 1;66(4):691-709.

20. Tsai PS. Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function, and evolution. *Gen Comp Endocrinol*. 2006 Aug;148(1):48-53.

21. Gautron JP, Pattou E, Bauer K, Kordon C. (Hydroxyproline(9)) luteinizing hormone-releasing hormone: A novel peptide in mammalian and frog hypothalamus. *Neurochem Int*. 1991;18(2):221-35.

22. Montaner AD, Mongiat L, Lux-Lantos VA, Park MK, Fischer WH, Craig AG, et al. Structure and biological activity of gonadotropin-releasing hormone isoforms isolated from rat and hamster brains. *Neuroendocrinology*. 2001 Sep;74(3):202-12.

23. Tello JA, Rivier JE, Sherwood NM. Tunicate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) peptides selectively activate *Ciona intestinalis* GnRH receptors and the green monkey type II GnRH receptor. *Endocrinology*. 2005 Sep;146(9):4061-73.
24. Fernald RD, White RB. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front Neuroendocrinol*. 1999 Jul;20(3):224-40.
25. Whitlock KE. Origin and development of GnRH neurons. *Trends Endocrinol Metab*. 2005 May-Jun;16(4):145-51.
26. Okubo K, Nagahama Y. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008 May;193(1):3-15.
27. Somoza GM, Lescheid DW, Miranda LA, Lo Nostro FL, Magliulo-Cepriano L, Montaner AD, et al. Expression of pejerrey gonadotropin-releasing hormone in three orders of fish. *Biol Reprod*. 2002 Dec;67(6):1864-71.
28. Millar R. [Recent research on GnRH receptors]. *Rev Prat*. 2005;Spec. No:12-5.
29. Millar R. [Recent data on GnRH receptors]. *Ann Urol (Paris)*. 2005 Oct;39 Suppl 3:S32-6.
30. Dubois EA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJ. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Res Bull*. 2002 Feb-Mar 1;57(3-4):413-8.
31. Millar RP. GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 2003 Jan;14(1):35-43.

32. Millar RP. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci.* 2005 Aug;88(1-2):5-28.
33. Cheon KW, Lee HS, Parhar IS, Kang IS. Expression of the second isoform of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod.* 2001 May;7(5):447-52.
34. Kasten TL, White SA, Norton TT, Bond CT, Adelman JP, Fernald RD. Characterization of two new preproGnRH mRNAs in the tree shrew: first direct evidence for mesencephalic GnRH gene expression in a placental mammal. *Gen Comp Endocrinol.* 1996 Oct;104(1):7-19.
35. Lescheid DW, Rosen GJ, Bridge AE, Jones RE, Warby CM, Sherwood NM. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is detected only in the form of chicken GnRH-II within the brain of the green anole, *Anolis carolinensis*. *Gen Comp Endocrinol.* 1997 Nov;108(2):247-57.
36. Lescheid DW, Terasawa E, Abler LA, Urbanski HF, Warby CM, Millar RP, et al. A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. *Endocrinology.* 1997 Dec;138(12):5618-29.
37. White RB, Fernald RD. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species. *Gen Comp Endocrinol.* 1998 Oct;112(1):17-25.
38. Adams BA, Vickers ED, Warby C, Park M, Fischer WH, Grey Craig A, et al. Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biol Reprod.* 2002 Jul;67(1):232-9.

39. Amano M, Oka Y, Yamanome T, Okuzawa K, Yamamori K. Three GnRH systems in the brain and pituitary of a pleuronectiform fish, the barfin flounder *Verasper moseri*. *Cell Tissue Res.* 2002 Aug;309(2):323-9.
40. Andersson E, Fjelldal PG, Klenke U, Vikingstad E, Taranger GL, Zohar Y, et al. Three forms of GnRH in the brain and pituitary of the turbot, *Scophthalmus maximus*: immunological characterization and seasonal variation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2001 Jun;129(2-3):551-8.
41. King JA, Millar RP. Multiple molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in teleost fish brain. *Peptides.* 1985 Jul-Aug;6(4):689-94.
42. Montaner AD, Park MK, Fischer WH, Craig AG, Chang JP, Somoza GM, et al. Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone in the brain of a teleost, Pejerrey. *Endocrinology.* 2001 Apr;142(4):1453-60.
43. Ngamvongchon S, Lovejoy DA, Fischer WH, Craig AG, Nahorniak CS, Peter RE, et al. Primary structures of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Mol Cell Neurosci.* 1992 Feb;3(1):17-22.
44. Powell JF, Fischer WH, Park M, Craig AG, Rivier JE, White SA, et al. Primary structure of solitary form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cichlid pituitary; three forms of GnRH in brain of cichlid and pumpkinseed fish. *Regul Pept.* 1995 May 4;57(1):43-53.

45. Powell JF, Zohar Y, Elizur A, Park M, Fischer WH, Craig AG, et al. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 6;91(25):12081-5.
46. Powell RC, Ciarcia G, Lance V, Millar RP, King JA. Identification of diverse molecular forms of GnRH in reptile brain. *Peptides*. 1986 Nov-Dec;7(6):1101-8.
47. Sherwood NM, Harvey B, Brownstein MJ, Eiden LE. Gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in striped mullet (*Mugil cephalus*), milkfish (*Chanos chanos*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*): comparison with salmon Gn-RH. *Gen Comp Endocrinol*. 1984 Aug;55(2):174-81.
48. Somoza GM, Stefano A, D'Eramo JL, Canosa LF, Fridman O. Immunoreactive GnRH suggesting a third form of GnRH in addition to cII GnRH and sGnRH in the brain and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Gen Comp Endocrinol*. 1994 Apr;94(1):44-52.
49. Weber GM, Powell JF, Park M, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, et al. Evidence that gonadotropin-releasing hormone (GnRH) functions as a prolactin-releasing factor in a teleost fish (*Oreochromis mossambicus*) and primary structures for three native GnRH molecules. *J Endocrinol*. 1997 Oct;155(1):121-32.
50. White SA, Kasten TL, Bond CT, Adelman JP, Fernald RD. Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 29;92(18):8363-7.

51. Yu KL, Sherwood NM, Peter RE. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides*. 1988 May-Jun;9(3):625-30.
52. Zmora N, Gonzalez-Martinez D, Munoz-Cueto JA, Madigou T, Mananos-Sanchez E, Doste SZ, et al. The GnRH system in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Endocrinol*. 2002 Jan;172(1):105-16.
53. Conlon JM, Collin F, Chiang YC, Sower SA, Vaudry H. Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone from the brain of the frog, *Rana ribibunda*: purification, characterization, and distribution. *Endocrinology*. 1993 May;132(5):2117-23.
54. King JA, Millar RP. Identification of His5,Trp7,Tyr8-GnRH (chicken GnRH II) in amphibian brain. *Peptides*. 1986 Sep-Oct;7(5):827-34.
55. Miranda LA, Paz DA, Affanni JM, Somoza GM. Identification and neuroanatomical distribution of immunoreactivity for mammalian gonadotropin-releasing hormone (mGnRH) in the brain and neural hypophyseal lobe of the toad *Bufo arenarum*. *Cell Tissue Res*. 1998 Sep;293(3):419-25.
56. Sherwood NM, Sower SA, Marshak DR, Fraser BA, Brownstein MJ. Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *J Biol Chem*. 1986 Apr 15;261(11):4812-9.
57. Sherwood NVS, K; Lescheid, DW. . Origin and evolution of GnRH in vertebrates and invertebrates. In: *GnRH Neurons. Gene to Behavior*; 1997.

58. King JA, Millar RP. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. II. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 1982 Sep 25;257(18):10729-32.
59. King JA, Millar RP. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. I. Structural determination on partially purified material. *J Biol Chem.* 1982 Sep 25;257(18):10722-8.
60. Miyamoto K, Hasegawa Y, Igarashi M, Chino N, Sakakibara S, Kangawa K, et al. Evidence that chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone is [Gln8]-LH-RH. *Life Sci.* 1983 Mar 21;32(12):1341-7.
61. Powell RC, Jach H, Millar RP, King JA. Identification of Gln8-GnRH and His5,Trp7,Tyr8-GnRH in the hypothalamus and extrahypothalamic brain of the ostrich (*Struthio camelus*). *Peptides.* 1987 Jan-Feb;8(1):185-90.
62. Powell RC, King JA, Millar RP. [Trp7,Leu8]LH-RH in reptilian brain. *Peptides.* 1985 Mar-Apr;6(2):223-7.
63. Dellovade TL, King JA, Millar RP, Rissman EF. Presence and differential distribution of distinct forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in the musk shrew brain. *Neuroendocrinology.* 1993 Aug;58(2):166-77.
64. King JA, Hinds LA, Mehl AE, Saunders NR, Millar RP. Chicken GnRH II occurs together with mammalian GnRH in a South American species of marsupial (*Monodelphis domestica*). *Peptides.* 1990 May-Jun;11(3):521-5.
65. King JA, Mehl AE, Tyndale-Biscoe CH, Hinds L, Millar RP. A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), with chicken GnRH II-like properties, occurs



together with mammalian GnRH in marsupial brains. *Endocrinology*. 1989 Nov;125(5):2244-52.

66. King JA, Millar RP. Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cell Mol Neurobiol*. 1995 Feb;15(1):5-23.

67. Yahalom D, Chen A, Ben-Aroya N, Rahimipour S, Kaganovsky E, Okon E, et al. The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform. *FEBS Lett*. 1999 Dec 17;463(3):289-94.

68. Morgan K, Sellar R, Pawson AJ, Lu ZL, Millar RP. Bovine and ovine gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-II ligand precursors and type II GnRH receptor genes are functionally inactivated. *Endocrinology*. 2006 Nov;147(11):5041-51.

69. Morgan K, Millar RP. Evolution of GnRH ligand precursors and GnRH receptors in protochordate and vertebrate species. *Gen Comp Endocrinol*. 2004 Dec;139(3):191-7.

70. Montaner A. Estudio de variants moleculares de gonadotropin-releasing hormone (GnRH) en cerebro de Carpincho *Hydrochoerus hydrochaeris* y otros roedores: Universidad Nacional del Litoral. Instituto de Neurociencias-Fc.Cs. Exactas y Naturales- UBA- CONICET; 2000.

71. Montaner AD, Gonzalez O, Paz DA, Affanni JM, Somoza GM. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) variants in a lizard brain: is mammalian GnRH being expressed? *Gen Comp Endocrinol*. 2000 Aug;119(2):121-31.

72. Leung PC, Cheng CK, Zhu XM. Multi-factorial role of GnRH-I and GnRH-II in the human ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 2003 Apr 28;202(1-2):145-53.

73. Dolan S, Evans NP, Richter TA, Nolan AM. Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor in sheep spinal cord. *Neurosci Lett*. 2003 Jul 31;346(1-2):120-2.
74. Bahk JY, Hyun JS, Chung SH, Lee H, Kim MO, Lee BH, et al. Stage specific identification of the expression of GnRH mRNA and localization of the GnRH receptor in mature rat and adult human testis. *J Urol*. 1995 Nov;154(5):1958-61.
75. Clayton RN, Eccleston L, Gossard F, Thalbard JC, Morel G. Rat granulosa cells express the gonadotrophin-releasing hormone gene: evidence from in-situ hybridization histochemistry. *J Mol Endocrinol*. 1992 Dec;9(3):189-95.
76. Azad N, Uddin S, La Paglia N, Kirsteins L, Emanuele NV, Lawrence AM, et al. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in rat prostate: characterization of LHRH peptide, messenger ribonucleic acid expression, and molecular processing of LHRH in intact and castrated male rats. *Endocrinology*. 1993 Sep;133(3):1252-7.
77. Dong KW, Chen ZG, Cheng KW, Yu KL. Evidence for estrogen receptor-mediated regulation of human gonadotropin-releasing hormone promoter activity in human placental cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1996 Mar 25;117(2):241-6.
78. Dong KW, Yu KL, Roberts JL. Identification of a major up-stream transcription start site for the human progonadotropin-releasing hormone gene used in reproductive tissues and cell lines. *Mol Endocrinol*. 1993 Dec;7(12):1654-66.

79. Kang SS, Kim SR, Leonhardt S, Jarry H, Wuttke W, Kim K. Effect of interleukin-1beta on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in castrated male rats. *J Neuroendocrinol.* 2000 May;12(5):421-9.
80. Whitelaw PF, Eidne KA, Sellar R, Smyth CD, Hillier SG. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovary. *Endocrinology.* 1995 Jan;136(1):172-9.
81. Caldani M, Batailler M, Thiery JC, Dubois MP. LHRH-immunoreactive structures in the sheep brain. *Histochemistry.* 1988;89(2):129-39.
82. Aten RF, Ireland JJ, Weems CW, Behrman HR. Presence of gonadotropin-releasing hormone-like proteins in bovine and ovine ovaries. *Endocrinology.* 1987 May;120(5):1727-33.
83. Ireland JJ, Aten RF, Behrman HR. GnRH-like proteins in cows: concentrations during corpora lutea development and selective localization in granulosa cells. *Biol Reprod.* 1988 Apr;38(3):544-50.
84. Clayton RN, Shakespear RA, Duncan JA, Marshall JC, Munson PJ, Rodbard D. Radioiodinated nondegradable gonadotropin-releasing hormone analogs: new probes for the investigation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology.* 1979 Dec;105(6):1369-76.
85. Harwood JP, Clayton RN, Catt KJ. Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. I. Properties and inhibition of luteal cell function. *Endocrinology.* 1980 Aug;107(2):407-13.

86. Harwood JP, Clayton RN, Chen TT, Knox G, Catt KJ. Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. II. Regulation and effects on ovarian development. *Endocrinology*. 1980 Aug;107(2):414-21.
87. Harwood JP, Richert ND, Dufau ML, Catt KJ. Gonadotropin-induced desensitization of epinephrine action in the luteinized rat ovary. *Endocrinology*. 1980 Jul;107(1):280-8.
88. Jones PB, Conn PM, Marian J, Hsueh AJ. Binding of gonadotropin releasing hormone agonist to rat ovarian granulosa cells. *Life Sci*. 1980 Dec 1;27(22):2125-32.
89. Latouche J, Crumeyrolle-Arias M, Jordan D, Kopp N, Augendre-Ferrante B, Cedard L, et al. GnRH receptors in human granulosa cells: anatomical localization and characterization by autoradiographic study. *Endocrinology*. 1989 Sep;125(3):1739-41.
90. Pieper DR, Richards JS, Marshall JC. Ovarian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors: characterization, distribution, and induction by GnRH. *Endocrinology*. 1981 Apr;108(4):1148-55.
91. Clayton RN, Katikineni M, Chan V, Dufau ML, Catt KJ. Direct inhibition of testicular function by gonadotropin-releasing hormone: mediation by specific gonadotropin-releasing hormone receptors in interstitial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Aug;77(8):4459-63.
92. Sharpe RM, Fraser HM. The role of LH in regulation of Leydig cell responsiveness to an LHRH agonist. *Mol Cell Endocrinol*. 1983 Dec;33(2-3):131-46.
93. Oikawa M, Dargan C, Ny T, Hsueh AJ. Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin-alpha messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology*. 1990 Nov;127(5):2350-6.

94. Raga F, Casan EM, Wen Y, Huang HY, Bonilla-Musoles F, Polan ML. Independent regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 in human endometrial stromal cells by gonadotropin-releasing hormone: implications in early human implantation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Feb;84(2):636-42.
95. Ramakrishnappa N, Rajamahendran R, Lin YM, Leung PC. GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. *Anim Reprod Sci.* 2005 Aug;88(1-2):95-113.
96. Botte MC, Chamagne AM, Carre MC, Counis R, Kottler ML. Fetal expression of GnRH and GnRH receptor genes in rat testis and ovary. *J Endocrinol.* 1998 Oct;159(1):179-89.
97. Botte MC, Lerrant Y, Lozach A, Berault A, Counis R, Kottler ML. LH down-regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor, but not GnRH, mRNA levels in the rat testis. *J Endocrinol.* 1999 Sep;162(3):409-15.
98. Bull P, Morales P, Huyser C, Socias T, Castellon EA. Expression of GnRH receptor in mouse and rat testicular germ cells. *Mol Hum Reprod.* 2000 Jul;6(7):582-6.
99. van Biljon W, Wykes S, Scherer S, Krawetz SA, Hapgood J. Type II gonadotropin-releasing hormone receptor transcripts in human sperm. *Biol Reprod.* 2002 Dec;67(6):1741-9.
100. Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD. Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Nov 30;189(1):289-95.

101. Kakar SS, Rahe CH, Neill JD. Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Domest Anim Endocrinol.* 1993 Oct;10(4):335-42.
102. Izumi S, Makino T, Iizuka R. Immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone in the seminal plasma and human semen parameters. *Fertil Steril.* 1985 Apr;43(4):617-20.
103. Herbert CA, Trigg TE. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Anim Reprod Sci.* 2005 Aug;88(1-2):141-53.
104. Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev.* 2004 Apr;25(2):235-75.
105. Advis JP, Kuljis RO, Dey G. Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) content and total LHRH-degrading activity (LHRH-DA) in the hypothalamus of the ewe. *Endocrinology.* 1985 Jun;116(6):2410-8.
106. Duittoz AH, Batailler M, Caldani M. Primary cell culture of LHRH neurones from embryonic olfactory placode in the sheep (*Ovis aries*). *J Neuroendocrinol.* 1997 Sep;9(9):669-75.
107. Zuccolilli G, Hamada, T., Ichikawa, M. and Mori, Y. Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Neuron in the Forebrain of Male Shiba Goat. *Journal of Reproduction and Development.* 1994;40(22):19-25.
108. Wray S, Hoffman G. Postnatal morphological changes in rat LHRH neurons correlated with sexual maturation. *Neuroendocrinology.* 1986;43(2):93-7.

108. Terasawa E, Quanbeck CD, Schulz CA, Burich AJ, Luchansky LL, Claude P. A primary cell culture system of luteinizing hormone releasing hormone neurons derived from embryonic olfactory placode in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 1993 Nov;133(5):2379-90.
109. Wray S, Grant P, Gainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(20):8132-6.
110. Wray S, Key S, Qualls R, Fueshko SM. A subset of peripherin positive olfactory axons delineates the luteinizing hormone releasing hormone neuronal migratory pathway in developing mouse. *Dev Biol*. 1994 Nov;166(1):349-54.
111. King JC, Anthony EL. LHRH neurons and their projections in humans and other mammals: species comparisons. *Peptides*. 1984;5 Suppl 1:195-207.
112. King JC, Anthony EL, Gustafson AW, Damassa DA. Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) cells and their projections in the forebrain of the bat *Myotis lucifugus lucifugus*. *Brain Res*. 1984 Apr 30;298(2):289-301.
113. Ronnekleiv OK, Resko JA. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone-containing neurons in early fetal development of rhesus macaques. *Endocrinology*. 1990 Jan;126(1):498-511.
114. Leshin LS, Rund LA, Crim JW, Kiser TE. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone and proopiomelanocortin neurons within the preoptic area and hypothalamus of the bovine brain. *Biol Reprod*. 1988 Nov;39(4):963-75.

115. Kineman RD, Leshin LS, Crim JW, Rampacek GB, Kraeling RR. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the forebrain of the pig. *Biol Reprod.* 1988 Oct;39(3):665-72.
116. Aujard F, Schilling A, Perret M. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactive neurons in male mouse lemurs following removal of the vomeronasal organ. *Brain Res.* 2005 May 10;1043(1-2):247-50.
117. Belda M, Covenas R, Narvaez JA, Aguirre JA, Tramu G. Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone in the upper brainstem and diencephalon of the cat: an immunocytochemical study. *Brain Res Bull.* 2000 Mar 1;51(4):281-91.
118. Caldani M, Antoine M, Batailler M, Duittoz A. Ontogeny of GnRH systems. *J Reprod Fertil Suppl.* 1995;49:147-62.
119. Melrose PA, Pickel C, Cheramie HS, Henk WG, Littlefield-Chabaud MA, French DD. Distribution and morphology of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the basal forebrain of ponies. *J Comp Neurol.* 1994 Jan 8;339(2):269-87.
120. Silva LS, H; Acosta, W; Portiansky, E; Zuccolilli, G. GnRH neurons population in the diencephalons of the coypu. *Rev Chil Anat.* 2000;18(1):123 -33.
121. Zuccolilli G, Ichikawa, M. and Mori, Y. Sexual Dimorphism in the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuron in the hypothalamus of Shiba Goat. *Journal of Reproduction and Development.* 1994;40(22):27-32.



122. Herbison AE, Porteous R, Pape JR, Mora JM, Hurst PR. Gonadotropin-releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation, and fertility. *Endocrinology*. 2008 Feb;149(2):597-604.
123. Wood RI, Newman SW, Lehman MN, Foster DL. GnRH neurons in the fetal lamb hypothalamus are similar in males and females. *Neuroendocrinology*. 1992 Apr;55(4):427-33.
124. Toumi FN, Martinet L, Peytevin J. Gonadotropin-releasing hormone neurons and pathways in the brain of the female mink (*Mustela vison*). *Cell Tissue Res*. 1992 Nov;270(2):383-93.
125. Leshin LS, Rund LA, Kraeling RR, Crim JW, Kiser TE. Morphological differences among luteinizing hormone releasing hormone neurons from postpartum and estrous cycling cows. *Neuroendocrinology*. 1992 Apr;55(4):380-9.
126. Tobet SA, Chickering TW, Sower SA. Relationship of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons to the olfactory system in developing lamprey (*Petromyzon marinus*). *J Comp Neurol*. 1996 Dec 2;376(1):97-111.
127. Korytko AI, Marcelino J, Blank JL. Differential testicular responses to short daylength in deer mice are reflected by regional and morphological differences in the GnRH neuronal system. *Brain Res*. 1995 Jul 10;685(1-2):135-42.
128. Urbanski HF, Doan A, Pierce M. Immunocytochemical investigation of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in Syrian hamsters maintained under long or short days. *Biol Reprod*. 1991 Apr;44(4):687-92.

129. Barry J. Immunofluorescence study of LRH-producing neurons in prosimians (Tupaia and Galago). *Cell Tissue Res.* 1980;206(3):355-65.
130. Lehman MN, Robinson JE, Karsch FJ, Silverman AJ. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J Comp Neurol.* 1986 Feb 1;244(1):19-35.
131. Sisk CL, Moss RL, Dudley CA. Immunocytochemical localization of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone in male ferrets. *Brain Res Bull.* 1988 Feb;20(2):157-61.
132. Jennes L, Conn PM. Gonadotropin-releasing hormone and its receptors in rat brain. *Front Neuroendocrinol.* 1994 Mar;15(1):51-77.
133. Jennes L, Stumpf WE. LHRH-systems in the brain of the golden hamster. *Cell Tissue Res.* 1980;209(2):239-56.
134. Phillips HS, Hostetter G, Kerdelhue B, Kozlowski GP. Immunocytochemical localization of LHRH in central olfactory pathways of hamster. *Brain Res.* 1980 Jul 14;193(2):574-9.
135. Latimer VS, Rodrigues SM, Garyfallou VT, Kohama SG, White RB, Fernald RD, et al. Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH-I and GnRH-II) are expressed by two separate populations of cells in the rhesus macaque hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000 Feb 22;75(2):287-92.

136. Dees WL, Sorensen AM, Jr., Kemp WM, McArthur NH. Immunohistochemical localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the brain and infundibulum of the sheep. *Cell Tissue Res.* 1981;215(1):181-91.
137. Hamada TS, T; Ichikawa, M and Mori, Y. Immunohistochemical study on gonadotropin-releasing hormone neurons in the shiba goat brain. *J Reprod Dev.* 1992;38:133 - 42.
138. Polkowska J, Dubois MP, Domanski E. Immunocytochemistry of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in the sheep hypothalamus during various reproductive stages: correlation with the gonadotropic hormones of the pituitary. *Cell Tissue Res.* 1980;208(2):327-41.
139. Wilson SI, Edlund T. Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci.* 2001 Nov;4 Suppl:1161-8.
140. Schoenwolf GC. Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. *Am J Anat.* 1984 Apr;169(4):361-76.
141. Schoenwolf GC, Desmond ME. Neural tube occlusion precedes rapid brain enlargement. *J Exp Zool.* 1984 Jun;230(3):405-7.
142. Nievelstein RA, Hartwig NG, Vermeij-Keers C, Valk J. Embryonic development of the mammalian caudal neural tube. *Teratology.* 1993 Jul;48(1):21-31.
143. Smith JL, Schoenwolf GC. Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation. *J Exp Zool.* 1989 Apr;250(1):49-62.

144. Keller R, Shih J, Sater AK, Moreno C. Planar induction of convergence and extension of the neural plate by the organizer of *Xenopus*. *Dev Dyn*. 1992 Mar;193(3):218-34.
145. Nakatsu T, Uwabe C, Shiota K. Neural tube closure in humans initiates at multiple sites: evidence from human embryos and implications for the pathogenesis of neural tube defects. *Anat Embryol (Berl)*. 2000 Jun;201(6):455-66.
146. Smith JL, Schoenwolf GC. Further evidence of extrinsic forces in bending of the neural plate. *J Comp Neurol*. 1991 May 8;307(2):225-36.
147. Smith JL, Schoenwolf GC. Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci*. 1997 Nov;20(11):510-7.
148. Lawson A, Anderson H, Schoenwolf GC. Cellular mechanisms of neural fold formation and morphogenesis in the chick embryo. *Anat Rec*. 2001 Feb 1;262(2):153-68.
149. Gilbert SF. *Biología del desarrollo*. Buenos Aires. Argentina; 2005.
150. Farbman AI, Buchholz JA. Growth of olfactory epithelial tissue in vitro: lectin staining of axons. *Microsc Res Tech*. 1992 Oct 15;23(2):173-80.
151. Schlosser G. Induction and specification of cranial placodes. *Dev Biol*. 2006 Jun 15;294(2):303-51.
152. Webb JF, Noden, D.M.,. Ectodermal placodes—Contributions to the development of the vertebrate head. *Am Zool*. 1993;33:434–47.
153. Northcutt RG, 1996. The origin of craniates: neural crest, neurogenic placodes, and homeobox genes. *Isr J Zool*. 1996;42: 273–313.

154. Baker CV, Bronner-Fraser M. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol.* 2001 Apr 1;232(1):1-61.
155. Schlosser G. Development and evolution of lateral line placodes in amphibians I. *Development. Zoology (Jena).* 2002;105(2):119-46.
156. Schlosser G. Evolutionary origins of vertebrate placodes: insights from developmental studies and from comparisons with other deuterostomes. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2005 Jul 15;304(4):347-99.
157. Streit A. Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Dev Biol.* 2004 Dec 1;276(1):1-15.
158. Schlosser G, Kintner C, Northcutt RG. Loss of ectodermal competence for lateral line placode formation in the direct developing frog *Eleutherodactylus coqui*. *Dev Biol.* 1999 Sep 15;213(2):354-69.
159. Schlosser G, Northcutt RG. Development of neurogenic placodes in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol.* 2000 Mar 6;418(2):121-46.
160. Schlosser G. Hypobranchial placodes in *Xenopus laevis* give rise to hypobranchial ganglia, a novel type of cranial ganglia. *Cell Tissue Res.* 2003 Apr;312(1):21-9.
161. Northcutt RG. The phylogeny of octavolateralis ontogenies: a reaffirmation of Garstang's hypothesis; 1992.
162. Northcutt RG. A reassessment of Goodrich's model of cranial nerve phylogeny. *Acta Anat (Basel).* 1993;148(2-3):71-80.

163. Northcutt RG, Bleckmann H. Pit organs in axolotls: a second class of lateral line neuromasts. *J Comp Physiol A*. 1993 May;172(4):439-46.
164. Schlosser G. Development and evolution of lateral line placodes in amphibians. - II. Evolutionary diversification. *Zoology (Jena)*. 2002;105(3):177-93.
165. Saka Y, Smith JC. Spatial and temporal patterns of cell division during early *Xenopus* embryogenesis. *Dev Biol*. 2001 Jan 15;229(2):307-18.
166. Washausen S, Obermayer B, Brunnett G, Kuhn HJ, Knabe W. Apoptosis and proliferation in developing, mature, and regressing epibranchial placodes. *Dev Biol*. 2005 Feb 1;278(1):86-102.
167. Noden DM. Cell movements and control of patterned tissue assembly during craniofacial development. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1991 Oct-Dec;11(4):192-213.
168. D'Amico-Martel A, Noden DM. Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *Am J Anat*. 1983 Apr;166(4):445-68.
169. Fode C, Gradwohl G, Morin X, Dierich A, LeMeur M, Golidis C, et al. The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron*. 1998 Mar;20(3):483-94.
170. Andermann P, Ungos J, Raible DW. Neurogenin1 defines zebrafish cranial sensory ganglia precursors. *Dev Biol*. 2002 Nov 1;251(1):45-58.
171. Begbie J, Ballivet M, Graham A. Early steps in the production of sensory neurons by the neurogenic placodes. *Mol Cell Neurosci*. 2002 Nov;21(3):502-11.

172. Crews L, Hunter D. Neurogenesis in the olfactory epithelium. *Perspect Dev Neurobiol.* 1994;2(2):151-61.
173. Calof AL, Rim PC, Askins KJ, Mumm JS, Gordon MK, Iannuzzelli P, et al. Factors regulating neurogenesis and programmed cell death in mouse olfactory epithelium. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Nov 30;855:226-9.
174. Schwob JE. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec.* 2002 Feb 15;269(1):33-49.
175. Beites CL, Kawauchi S, Crocker CE, Calof AL. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res.* 2005 Jun 10;306(2):309-16.
176. Mendoza AS, Breipohl W, Miragall F. Cell migration from the chick olfactory placode: a light and electron microscopic study. *J Embryol Exp Morphol.* 1982 Jun;69:47-59.
177. Klein SL, Graziadei PP. The differentiation of the olfactory placode in *Xenopus laevis*: a light and electron microscope study. *J Comp Neurol.* 1983 Jun 10;217(1):17-30.
178. Couly GF, Le Douarin NM. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev Biol.* 1985 Aug;110(2):422-39.
179. Hansen A, Zeiske E. Development of the olfactory organ in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Comp Neurol.* 1993 Jul 8;333(2):289-300.

180. Zeiske E, Kasumyan A, Bartsch P, Hansen A. Early development of the olfactory organ in sturgeons of the genus *Acipenser*: a comparative and electron microscopic study. *Anat Embryol (Berl)*. 2003 Apr;206(5):357-72.
181. Brunjes PC, Frazier LL. Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates. *Brain Res*. 1986 Mar;396(1):1-45.
182. Farbman AI. Developmental biology of olfactory sensory neurons. *Semin Cell Biol*. 1994 Feb;5(1):3-10.
183. Reiss JO, Burd GD. Cellular and molecular interactions in the development of the *Xenopus* olfactory system. *Semin Cell Dev Biol*. 1997 Apr;8(2):171-9.
184. Buck LB. Olfactory receptors and odor coding in mammals. *Nutr Rev*. 2004 Nov;62(11 Pt 2):S184-8; discussion S224-41.
185. Chuah MI, Au C. Olfactory Schwann cells are derived from precursor cells in the olfactory epithelium. *J Neurosci Res*. 1991 Jun;29(2):172-80.
186. Norgren RB, Jr., Ratner N, Brackenbury R. Development of olfactory nerve glia defined by a monoclonal antibody specific for Schwann cells. *Dev Dyn*. 1992 Jul;194(3):231-8.
187. Ramon-Cueto A, Avila J. Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res Bull*. 1998 Jun;46(3):175-87.
188. Whitlock KE. A new model for olfactory placode development. *Brain Behav Evol*. 2004;64(3):126-40.



189. Whitlock KE, Westerfield M. The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development*. 2000 Sep;127(17):3645-53.
190. Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res*. 1989 Dec;6(4):311-26.
191. Tarozzo G, Peretto P, Biffo S, Varga Z, Nicholls JG, Fasolo A. Development and migration of olfactory neurones in the nervous system of the neonatal opossum. *Proc Biol Sci*. 1995 Oct 23;262(1363):95-101.
192. Tarozzo G, Peretto P, Fasolo A. Cell migration from the olfactory placode and the ontogeny of the neuroendocrine compartments. *Zoolog Sci*. 1995 Aug;12(4):367-83.
193. Wray S. Development of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Front Neuroendocrinol*. 2002 Jul;23(3):292-316.
194. Murakami S, Arai Y. Direct evidence for the migration of LHRH neurons from the nasal region to the forebrain in the chick embryo: a carbocyanine dye analysis. *Neurosci Res*. 1994 May;19(3):331-8.
195. Northcutt RG, Muske LE. Multiple embryonic origins of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactive neurons. *Brain Res Dev Brain Res*. 1994 Apr 15;78(2):279-90.

196. Dellovade TL, Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda M. The gonadotropin-releasing hormone system does not develop in Small-Eye (Sey) mouse phenotype. *Brain Res Dev Brain Res*. 1998 May 15;107(2):233-40.
197. Daikoku S. The olfactory origin of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons. A new era in reproduction physiology. *Arch Histol Cytol*. 1999 May;62(2):107-17.
198. Bless EP, Walker HJ, Yu KW, Knoll JG, Moenter SM, Schwarting GA, et al. Live view of gonadotropin-releasing hormone containing neuron migration. *Endocrinology*. 2005 Jan;146(1):463-8.
199. el Amraoui A, Dubois PM. Experimental evidence for an early commitment of gonadotropin-releasing hormone neurons, with special regard to their origin from the ectoderm of nasal cavity presumptive territory. *Neuroendocrinology*. 1993 Jun;57(6):991-1002.
200. Muske LE, Moore FL. The nervus terminalis in amphibians: anatomy, chemistry and relationship with the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone system. *Brain Behav Evol*. 1988;32(3):141-50.
201. Demski LS. Terminal nerve complex. *Acta Anat (Basel)*. 1993;148(2-3):81-95.
202. von Bartheld CS, Baker CV. Nervus terminalis derived from the neural crest? A surprising new turn in a century-old debate. *Anat Rec B New Anat*. 2004 May;278(1):12-3.
203. Eisthen HL, Delay RJ, Wirsig-Wiechmann CR, Dionne VE. Neuromodulatory effects of gonadotropin releasing hormone on olfactory receptor neurons. *J Neurosci*. 2000 Jun 1;20(11):3947-55.

204. Abe H, Oka Y. Modulation of pacemaker activity by salmon gonadotropin-releasing hormone (sGnRH) in terminal nerve (TN)-GnRH neurons. *J Neurophysiol.* 2000 May;83(5):3196-200.
205. Park D, Eisthen HL. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) modulates odorant responses in the peripheral olfactory system of axolotls. *J Neurophysiol.* 2003 Aug;90(2):731-8.
206. Schwanzel-Fukuda M, Abraham S, Crossin KL, Edelman GM, Pfaff DW. Immunocytochemical demonstration of neural cell adhesion molecule (NCAM) along the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in mice. *J Comp Neurol.* 1992 Jul 1;321(1):1-18.
207. Daikoku S, Koide I, Chikamori-Aoyama M, Shimomura Y. Migration of LHRH neurons derived from the olfactory placode in rats. *Arch Histol Cytol.* 1993 Oct;56(4):353-70.
208. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature.* 1989 Mar 9;338(6211):161-4.
209. Schwanzel-Fukuda M, Reinhard GR, Abraham S, Crossin KL, Edelman GM, Pfaff DW. Antibody to neural cell adhesion molecule can disrupt the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons into the mouse brain. *J Comp Neurol.* 1994 Apr 8;342(2):174-85.
210. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and neural cell adhesion molecule (NCAM)-immunoreactivity in development of the forebrain and reproductive system. *Ann Endocrinol (Paris).* 1994;55(6):235-41.

211. Schwanzel-Fukuda M, Robinson JA, Silverman AJ. The fetal development of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal systems of the guinea pig brain. *Brain Res Bull.* 1981 Sep;7(3):293-315.
212. Zheng LM, Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda M. Electron microscopic identification of luteinizing hormone-releasing hormone-immunoreactive neurons in the medial olfactory placode and basal forebrain of embryonic mice. *Neuroscience.* 1992;46(2):407-18.
213. Yoshida K, Tobet SA, Crandall JE, Jimenez TP, Schwarting GA. The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve. *J Neurosci.* 1995 Dec;15(12):7769-77.
214. Yamamoto N, Uchiyama H, Ohki-Hamazaki H, Tanaka H, Ito H. Migration of GnRH-immunoreactive neurons from the olfactory placode to the brain: a study using avian embryonic chimeras. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996 Sep 2;95(2):234-44.
215. Murakami S, Kikuyama S, Arai Y. The origin of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in newts (*Cynops pyrrhogaster*): the effect of olfactory placode ablation. *Cell Tissue Res.* 1992 Jul;269(1):21-7.
216. Akutsu S, Takada M, Ohki-Hamazaki H, Murakami S, Arai Y. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in the chick embryo: effect of the olfactory placode ablation. *Neurosci Lett.* 1992 Aug 17;142(2):241-4.
217. Whitlock KE, Wolf CD, Boyce ML. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells arise from cranial neural crest and adenohipophyseal regions of the neural plate in the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev Biol.* 2003 May 1;257(1):140-52.

218. Kioussi C, O'Connell S, St-Onge L, Treier M, Gleiberman AS, Gruss P, et al. Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 7;96(25):14378-82.
219. elAmraoui A, Dubois PM. Experimental evidence for the early commitment of the presumptive adenohypophysis. *Neuroendocrinology*. 1993 Dec;58(6):609-15.
220. Gopinath A, Andrew Tseng L, Whitlock KE. Temporal and spatial expression of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the brain of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Gene Expr Patterns*. 2004 Jan;4(1):65-70.
221. Parhar IS, Soga T, Ishikawa Y, Nagahama Y, Sakuma Y. Neurons synthesizing gonadotropin-releasing hormone mRNA subtypes have multiple developmental origins in the medaka. *J Comp Neurol*. 1998 Nov 16;401(2):217-26.
222. Herzog W, Zeng X, Lele Z, Sonntag C, Ting JW, Chang CY, et al. Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog. *Dev Biol*. 2003 Feb 1;254(1):36-49.
223. Sbrogna JL, Barresi MJ, Karlstrom RO. Multiple roles for Hedgehog signaling in zebrafish pituitary development. *Dev Biol*. 2003 Feb 1;254(1):19-35.
224. Karlstrom RO, Talbot WS, Schier AF. Comparative synteny cloning of zebrafish you-too: mutations in the Hedgehog target gli2 affect ventral forebrain patterning. *Genes Dev*. 1999 Feb 15;13(4):388-93.
225. Murakami S, Seki T, Arai Y. Structural and chemical guidance cues for the migration of GnRH neurons in the chick embryo. *Prog Brain Res*. 2002;141:31-44.

226. White RB, Fernald RD. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression reveals a distinct origin for GnRH-containing neurons in the midbrain. *Gen Comp Endocrinol.* 1998 Dec;112(3):322-9.
227. Daikoku-Ishido H, Okamura Y, Yanaihara N, Daikoku S. Development of the hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone-containing neuron system in the rat: in vivo and in transplantation studies. *Dev Biol.* 1990 Aug;140(2):374-87.
228. Schwanzel-Fukuda M, Morrell JI, Pfaff DW. Ontogenesis of neurons producing luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the nervus terminalis of the rat. *J Comp Neurol.* 1985 Aug 15;238(3):348-64.
229. Parhar I, Pfaff D, Schwanzel-Fukuda M. Genes and behavior as studied through gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons: comparative and functional aspects. *Cell Mol Neurobiol.* 1995 Feb;15(1):107-16.
230. Schwanzel-Fukuda M, Crossin KL, Pfaff DW, Bouloux PM, Hardelin JP, Petit C. Migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. *J Comp Neurol.* 1996 Mar 11;366(3):547-57.
231. Quanbeck C, Sherwood NM, Millar RP, Terasawa E. Two populations of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the forebrain of the rhesus macaque during embryonic development. *J Comp Neurol.* 1997 Apr 14;380(3):293-309.
232. Boehm N, Roos J, Gasser B. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells in the nasal septum of human fetuses. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994 Oct 14;82(1-2):175-80.

233. Danchin E, Dubois MP. Immunocytological study of the chronology of pituitary cytogenesis in the domestic pig (*Sus scrofa*) with special reference to the functioning of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Reprod Nutr Dev*. 1982;22(1A):135-51.
234. Polkowska J, Liwska J, Dubois MP. Ontogeny of neuropeptidergic systems: luteinizing hormone releasing hormone (LHRH); somatostatin (SRIF) and neurophysin (NF) in the hypothalamus of the domestic pig by immunocytochemistry. *Folia Histochem Cytobiol*. 1985;23(4):193-200.
235. Daikoku S, Koide I. Spatiotemporal appearance of developing LHRH neurons in the rat brain. *J Comp Neurol*. 1998 Mar 30;393(1):34-47.
236. Tobet SA, Schwarting GA. Minireview: recent progress in gonadotropin-releasing hormone neuronal migration. *Endocrinology*. 2006 Mar;147(3):1159-65.
237. Cariboni A, Hickok J, Rakic S, Andrews W, Maggi R, Tischkau S, et al. Neuropilins and their ligands are important in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci*. 2007 Feb 28;27(9):2387-95.
238. Cariboni A, Maggi R, Parnavelas JG. From nose to fertility: the long migratory journey of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Trends Neurosci*. 2007 Dec;30(12):638-44.
239. Wierman ME, Pawlowski JE, Allen MP, Xu M, Linseman DA, Nielsen-Preiss S. Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone neuronal migration. *Trends Endocrinol Metab*. 2004 Apr;15(3):96-102.

240. Corradi A, Croci L, Broccoli V, Zecchini S, Previtali S, Wurst W, et al. Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. *Development*. 2003 Jan;130(2):401-10.
241. Tran PB, Miller RJ. Chemokine receptors in the brain: a developing story. *J Comp Neurol*. 2003 Feb 24;457(1):1-6.
242. Magni P, Dozio E, Ruscica M, Watanobe H, Cariboni A, Zaninetti R, et al. Leukemia inhibitory factor induces the chemomigration of immortalized gonadotropin-releasing hormone neurons through the independent activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3, mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Mol Endocrinol*. 2007 May;21(5):1163-74.
243. Schwarting GA, Henion TR, Nugent JD, Caplan B, Tobet S. Stromal cell-derived factor-1 (chemokine C-X-C motif ligand 12) and chemokine C-X-C motif receptor 4 are required for migration of gonadotropin-releasing hormone neurons to the forebrain. *J Neurosci*. 2006 Jun 21;26(25):6834-40.
244. Giacobini P, Giampietro C, Fioretto M, Maggi R, Cariboni A, Perroteau I, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor facilitates migration of GN-11 immortalized LHRH neurons. *Endocrinology*. 2002 Sep;143(9):3306-15.
245. Giacobini P, Messina A, Wray S, Giampietro C, Crepaldi T, Carmeliet P, et al. Hepatocyte growth factor acts as a motogen and guidance signal for gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration. *J Neurosci*. 2007 Jan 10;27(2):431-45.



246. Okubo K, Sakai F, Lau EL, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Naruse K, et al. Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: insights from transgenic medaka and the relevance to X-linked Kallmann syndrome. *Endocrinology*. 2006 Mar;147(3):1076-84.
247. Cariboni A, Pimpinelli F, Colamarino S, Zaninetti R, Piccolella M, Rumio C, et al. The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *Hum Mol Genet*. 2004 Nov 15;13(22):2781-91.
248. Kramer PR, Wray S. Novel gene expressed in nasal region influences outgrowth of olfactory axons and migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons. *Genes Dev*. 2000 Jul 15;14(14):1824-34.
249. 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. *Endocrinology*. 1998 Jun;139(6):2734-40.
250. Giacobini P, Kopin AS, Beart PM, Mercer LD, Fasolo A, Wray S. Cholecystokinin modulates migration of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *J Neurosci*. 2004 May 19;24(20):4737-48.
251. Cariboni A, Rakic S, Liapi A, Maggi R, Goffinet A, Parnavelas JG. Reelin provides an inhibitory signal in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Development*. 2005 Nov;132(21):4709-18.

252. Schwarting GA, Kostek C, Bless EP, Ahmad N, Tobet SA. Deleted in colorectal cancer (DCC) regulates the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the basal forebrain. *J Neurosci*. 2001 Feb 1;21(3):911-9.
253. Fueshko S, Wray S. LHRH cells migrate on peripherin fibers in embryonic olfactory explant cultures: an in vitro model for neurophilic neuronal migration. *Dev Biol*. 1994 Nov;166(1):331-48.
254. Tissir F, Goffinet AM. Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Jun;4(6):496-505.
255. 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. *Endocrinology*. 2000 Mar;141(3):1254-62.
256. Heger S, Seney M, Bless E, Schwarting GA, Bilger M, Mungenast A, et al. Overexpression of glutamic acid decarboxylase-67 (GAD-67) in gonadotropin-releasing hormone neurons disrupts migratory fate and female reproductive function in mice. *Endocrinology*. 2003 Jun;144(6):2566-79.
257. Gill JC, Tsai PS. Expression of a dominant negative FGF receptor in developing GNRH1 neurons disrupts axon outgrowth and targeting to the median eminence. *Biol Reprod*. 2006 Mar;74(3):463-72.
258. Nissl F. Die grosshirnanteile des kaninchens. *Neurol Nervkrankh*. 1913;52:867-953.
259. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec*. 1946 Feb;94:239-47.

260. Kähn W. *Veterinary Reproductive Ultrasonography* First ed. Hannover. Germany; 1994.
261. Puelles L. Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 Oct 29;356(1414):1583-98.
262. Puelles L, Amat JA, Martinez-de-la-Torre M. Segment-related, mosaic neurogenetic pattern in the forebrain and mesencephalon of early chick embryos: I. Topography of AChE-positive neuroblasts up to stage HH18. *J Comp Neurol.* 1987 Dec 8;266(2):247-68.
263. Guilgur LG, Strussmann CA, Somoza GM. mRNA expression of GnRH variants and receptors in the brain, pituitary and ovaries of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in relation to the reproductive status. *Fish Physiol Biochem.* 2009 Mar;35(1):157-66.
264. Mongiat LA, Fernandez MO, Lux-Lantos VA, Guilgur LG, Somoza GM, Libertun C. Experimental data supporting the expression of the highly conserved GnRH-II in the brain and pituitary gland of rats. *Regul Pept.* 2006 Sep 11;136(1-3):50-7.
265. King JA, Steneveld AA, Curlewis JD, Rissman EF, Millar RP. Identification of chicken GnRH II in brains of metatherian and early-evolved eutherian species of mammals. *Regul Pept.* 1994 Dec 15;54(2-3):467-77.
266. Silverman AJ, Asarian L, Khalil M, Silver R. GnRH, brain mast cells and behavior. *Prog Brain Res.* 2002;141:315-25.

## 8. ANEXOS

### 8.1. SOLUCIONES

#### **Buffer de fosfatos (PB) 0,2M (pH 7,4)**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ----- 7,17 g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O ----- 55,15 g  
 Agua destilada ----- hasta 1000 ml

#### **Buffer de fosfatos salino (PBS) 0.1M (pH 7,4)**

NaCl ----- 9 g  
 PB 0,2M ----- 500 ml  
 Agua destilada ----- hasta 1000 ml

#### **Buffer fosfato 0,1M salino con tritón 0,4% (PBS-T)**

Tritón X-1000 ----- 4 ml  
 PBS ----- 996 ml

#### **Paraformaldehído 4% en 0.1 M buffer de fosfatos (pH 7,2 - 7,4)**

Solución A: solución de paraformaldehído 10% agua destilada (disolver a 70°C y agregar OHK para aclarar).

Solución B: buffer de fosfatos 0.2 M (pH 7.2)

Solución A 40% + Solución B 50% + agua destilada 10%.

#### **Solución Fijadora de Zamboni (Paraformaldehído 4% - ácido pícrico en PB 0.1 M pH 7.4)**

Paraformaldehído 10% solution	(40%)	400 ml
Buffer defosfatos (PB) 0.2 M	(50%)	500 ml
Ácido Pírico Saturado	(7%)	70 ml
Agua destilada	(3%)	30 ml
Mezclar antes de usar		1,000 ml

#### **Solución crioprotectora (solución de Olmos)**

Sucrosa ----- 30 g  
 Etilenglicol ----- 30 ml  
 Polivinilpirrolidona ----- 1 g  
 Buffer fosfato 0,4M ----- 25 ml  
 Ajustar volumen hasta 100 ml con agua destilada

## 8.2. MÉTODO DE INCLUSIÓN EN GELATINA

### Método de gelatina-glicerina para la formación de bloque

#### 1. Solución de gelatina-glicerina

Gelatina ----- 16 g

Glicerina ----- 15 ml

Agua destilada ----- 70 ml

Timol ----- 1 cristal pequeño

2. Lavar el tejido previamente fijado en agua corriente.
3. Transferir el tejido a una solución de gelatina-glicerina a 37°C durante 6/8 hs.
4. Transferir el tejido a una solución fresca de gelatina-glicerina, mezclar y embeber en un molde y alojarla en heladera a 4°C.
5. Retirar el exceso de gelatina del bloque.
6. Endurecer el bloque en paraformaldehído 4% o formol-calcio 10% durante toda la noche.

### Cubierta de gelatina para portaobjetos

#### 1. Preparación de soluciones

a. Solución A: gelatina 0.6% en agua destilada (llevar a 60°C y agitar hasta solución)

b. Solución B: sulfato crómico de potasio ( $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 0.6% en agua destilada.

2. Mezclar en partes iguales las soluciones A y B. Si hay persistencia de burbujas calentar y agitar nuevamente a 70°C.
3. Sumergir los portaobjetos 30 minutos, retirar y llevar a estufa durante 30 minutos como mínimo.

### **8.3. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA**

- 8.3.1 Lavar las secciones en PBS-T, dos veces consecutivas (10 minutos cada lavado).
- 8.3.1. Bloqueo de reacciones no específicas. Incubar las secciones con suero normal equino, 150µl en 10 ml de PBS-T durante 40 minutos a temperatura ambiente. De preferencia el suero utilizado debe provenir de la misma especie en la cual el anticuerpo secundario fue hecho. Se utiliza un total de 3,5 a 5 ml por receptáculo.
- 8.3.2. Lavar las secciones en PBS-T, dos veces consecutivas (10 minutos cada lavado).
- 8.3.3. Incubación con el anticuerpo primario. Incubar las secciones con el anticuerpo monoclonal LHR 13, en dilución de 1:2500 – 1/5000 en PBS-T, durante 40 hs a 4°C.
- 8.3.4. Lavar las secciones en PBS-T, dos veces consecutivas (10 minutos cada lavado)..
- 8.3.5. Incubación con el anticuerpo secundario (Vectastain Universal Elite ABC Kit, Vector Laboratories INC. U.S.A). Incubar las secciones con el anticuerpo (antiglobulina purificada) biotinilada, 50 µl en 10 ml de PBS-T durante 1 h a temperatura ambiente.
- 8.3.6. Lavar las secciones en PBS-T, dos veces consecutivas (10 minutos cada lavado).
- 8.3.7. Eliminación de la peroxidasa endógena. Incubar las secciones con una solución de peróxido de hidrógeno 0,3% en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 8.3.8. Lavar las secciones en PBS-T, dos veces consecutivas (10 minutos cada lavado).
- 8.3.9. Complejo Avidina-Biotina (Vectastain Universal Elite ABC Kit, Vector Laboratories, INC. U.S.A). Incubar las secciones con una solución de avidina (100µl) más biotina (100 µl) en 10 ml de PBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 8.3.10. Lavar las secciones en PBS-T, dos veces (10 minutos) consecutivas.
- 8.3.11. Revelado. Incubar las secciones en la solución reveladora (3,3-diamino benzidina tetrahydroclorato (DAB Sigma) 0.05% + peróxido de hidrógeno 0.25% en PB 0.1M)

durante algunos minutos (1–5) hasta observar coloración marrón. Controlar la reacción bajo microscopio.

8.3.12. Lavar las secciones en PBS, tres veces consecutivas (10 minutos cada lavado).

8.3.13. Realizar coloración de contraste (histoquímica de Nissl)

8.3.14. Deshidratar en alcoholes, xilol y montar con DPX (Surgipath Medical Industries, Inc.).

#### **8.4. HISTOQUÍMICA DE NISSL**

- 8.4.1. Solución Colorante: acetato de violeta de cresilo (Merck & Co., Inc. USA) al 1% en buffer de acetato 0.1 M, pH 4.
- 8.4.2. Hidratar las secciones ya montadas sobre portaobjetos gelatinados en agua destilada durante 30 segundos.
- 8.4.3. Sumergir las secciones en la solución colorante durante 3 - 5 minutos (controlar intensidad de coloración).
- 8.4.4. Lavar las secciones con agua corriente para eliminar el exceso de colorante.
- 8.4.5. Escurrir el exceso de agua y sumergir las secciones en agua destilada durante 30 segundos
- 8.4.6. Deshidratar las secciones en:
  - Alcohol 70% durante 30 segundos.
  - Alcohol 80% durante 1 minuto.
  - Alcohol 96% durante 1 minuto (3 pasos).
  - Alcohol absoluto 2 minutos (3 pasos).
  - Alcohol+Cloroformo (3/1) 3 minutos.
- 8.4.7. Clarificar las secciones en xilol (3 pasos) durante 3 min.
- 8.4.8. Cubrir las secciones con cubreobjetos utilizando DPX (Surgipath Medical Industries, Inc.).