

Tesis de Licenciatura

Identificación de mGnRH (Mammalian Gonadotropin releasing hormone) en distintas áreas cerebrales del armadillo Chaetophractus villosus (Edentata)

Stolowicz, Fabiana Gisela

1997

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

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

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

Cita tipo APA:

Stolowicz, Fabiana Gisela. (1997). Identificación de mGnRH (Mammalian Gonadotropin releasing hormone) en distintas áreas cerebrales del armadillo Chaetophractus villosus (Edentata). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000513_Stolowicz

Cita tipo Chicago:

Stolowicz, Fabiana Gisela. "Identificación de mGnRH (Mammalian Gonadotropin releasing hormone) en distintas áreas cerebrales del armadillo Chaetophractus villosus (Edentata)". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

1997. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000513_Stolowicz

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

TESIS DE LICENCIATURA

**IDENTIFICACION DE mGnRH (MAMMALIAN GONADOTROPIN
RELEASING HORMONE) EN DISTINTAS AREAS CEREBRALES
DEL ARMADILLO CHAETOPHRACTUS VILLOSUS (EDENTATA).**

AUTOR: FABIANA GISELA STOLOWICZ

DIRECTOR DE LA TESIS DE LICENCIATURA: Dr. JORGE M. AFFANNI

CO-DIRECTOR DE LA TESIS DE LICENCIATURA: Dr. GUSTAVO M. SOMOZA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS (INEUCI-CONICET-UBA)

Abril, 1997

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas, que de una u otra forma, hicieron posible la realización de mi Tesis de Licenciatura.

Al Dr. Affanni, por haberme brindado la posibilidad y el apoyo para realizar este seminario.

A la Dra. Benitez, por haber colaborado en mi trabajo realizando la disección de las distintas áreas cerebrales del “peludo”.

Al Dr. Gustavo Somoza, por haberme permitido iniciarme en la investigación y guiarme en la realización de la Tesis.

Al Dr. Vitale y la gente del dto de química orgánica, por su ayuda desinteresada y la facilitación de los medios para llevar a cabo mi Tesis.

A Andy, quisiera agradecerle el haber estado siempre a mi lado, su ayuda desinteresada y su inmensa colaboración.

A Ale y Cinthia, así como a los chicos del laboratorio 54, 80 y a Diego por los lindos momentos compartidos.

A Vicky, mi eterna amiga de la facultad, con quien nos apoyamos momento a momento y a quien estoy muy agradecida

A mis compañeros de estudio, con quien compartimos gratos momentos.

A Sergio, por su ayuda desinteresada y su gran apoyo.

A mis amigas del alma, por todo.

A mi familia, por sentirlos cerca y apoyándome a cada instante.

Trabajos que surgieron a partir de la realización de esta Tesis de Licenciatura

XI jornadas Argentinas de Mastozoología-SAREM (11/96)

“Identificación y Distribución Anatómica de mGnRH (mammalian Gonadotropin Releasing Hormone) en el encéfalo del armadillo *Chaetophractus villosus* (Dasypodidae).

Rodríguez gil D., Stolorowicz F., Somoza G., King J., Affanni J.

Gonadotropin-Releasing Hormone in the brain of the South american armadillo *Chaetophractus villosus* (Edentata). Characterization and immunohistochemical localization.

Rodríguez gil D., Stolorowicz F., Somoza G., King J., Aldana-Marcos H. and Affanni J. En elaboración.

INDICE DE TEMAS

I. INTRODUCCION	5
I.1. ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA PRECURSORA DE GnRH.....	8
I.2. DISTRIBUCIÓN TAXONÓMICA Y PROBABLES FUNCIONES DE GnRH EN VERTEBRADOS	10
I.3. EVOLUCIÓN DE LAS MÚLTIPLES FORMAS DE GnRH.....	14
I.4. MODELO EXPERIMENTAL	15
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
II.1. ANIMALES Y TÉCNICA QUIRURGICA.....	17
II.2. EXTRACCIÓN	18
II.3. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN DE FASE REVERSA (RP-HPLC)	18
II.4. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA).....	20
II.5. RADIOIODINACIÓN.....	23
II.5.1. <i>sGnRH</i> y <i>clGnRH</i>	23
II.5.2. <i>mGnRH</i>	24
III. RESULTADOS	27
IV. CONCLUSIONES Y DISCUSION	42
V. BIBLIOGRAFIA.....	46

I. INTRODUCCION

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es un neuropéptido clave en el control del desarrollo y mantenimiento de las funciones reproductivas. La liberación pulsátil de este decapeptido, por células neurosecretoras localizadas en el área preóptico-hipotalámica, estimula la síntesis y secreción de gonadotrofinas adenohipofisarias, las cuales a su vez estimulan la gametogénesis y esteroidogénesis en las gónadas (Fink, 1988).

Hacia fines de los años '40 Green y Harris (1947) hipotetizaron acerca de la existencia de un factor hipotalámico relacionado con la secreción de gonadotrofinas. Sin embargo, recién veinte años después, pudo aislarse y secuenciarse a partir de hipotálamos porcinos y ovinos (Matsuo et al, 1971; Burgus et al, 1972).

Originariamente GnRH fue considerada como una única variante molecular, pero evidencias inmunológicas posteriores, revelaron la presencia de otras formas en el cerebro de vertebrados no mamíferos (King and Millar, 1979; King and Millar, 1980). Hasta el momento han sido secuenciados nueve péptidos GnRH diferentes en vertebrados (Gothilf et al., 1995) y otras dos variantes en protocordados (Powell et al., 1996). Como convención, estas variantes reciben el nombre del animal del cual han sido aislados por primera vez.

La estructura de GnRH, aislada por primera vez a partir de porcinos (Matsuo et al., 1971) y ovinos (Burgus et al., 1972) e identificada como mammalian GnRH (mGnRH), permanece conservada en ratón (Mason et al., 1986), rata (Adelman et al., 1986) y humanos (Seeburg & Adelman., 1984; Adelman et al., 1986). En mamíferos y anfibios anuros se ha encontrado además una forma modificada enzimáticamente denominada hidroxiprolina mGnRH (Gautron et al., 1991; King et al., 1994).

A partir de cerebros de gallinas se identificaron dos variantes denominadas chicken I GnRH (cIGnRH) (King & Millar., 1982a; 1982b; Miyamoto et al., 1983), y una segunda forma: chicken II GnRH (cIIIGnRH) (Miyamoto et al., 1984).

En peces fueron aisladas y secuenciadas cuatro variantes a partir de extractos cerebrales: salmon GnRH (sGnRH) (Sherwood et al., 1983), catfish GnRH (cfGnRH) (Ngamvongchon et al., 1992), seabream GnRH (sbGnRH) (Powell et al., 1994) y dogfish GnRH (dfGnRH) (Lovejoy et al., 1992). En lampreas fueron identificadas otras dos variantes: lamprea I GnRH (LIGnRH) (Sherwood et al., 1986a) y lamprea III GnRH (LIIIGnRH) (Sower et al., 1993).

Por otra parte en protocordados, recientemente se han aislado dos variantes a partir de extractos de la ascidia *Chelysoma productum*: Tunicate I GnRH (tIGnRH) y Tunicate II GnRH (tIIIGnRH) (Powell et al., 1996.). Tabla I.

mGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH₂
cIGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly-NH₂
sbGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH₂
cfGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly-NH₂
sGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH₂
dfGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH₂
cIIIGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly-NH₂
LIIIGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly-NH₂
LIGnRH	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly-NH₂
tIGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Asp	Tyr	Phe	Lys	Pro	Gly-NH₂
tIIIGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Leu	Cys	His	Ala	Pro	Gly-NH₂

Tabla I: Estructura primaria de las variantes moleculares de GnRH secuenciadas hasta el momento.

Todas estas moléculas pueden agruparse dentro de una misma familia debido a que comparten las siguientes características:

1. La longitud de la molécula (10 aminoácidos) permanece invariante.
2. Los aminoácidos 1: pGlu, 2: His, 4: Ser, 9: Pro y 10: Gly-NH₂ se encuentran conservados.
3. Los extremos amino y carboxilo se encuentran modificados. El extremo amino se encuentra en forma de un piroglutámico (pGlu) y el extremo carboxilo se encuentra amidado (Gly-NH₂).
4. En vertebrados, todas estas variantes inducen la liberación de gonadotrofinas hipofisarias.

Como se observa en la Tabla I, la posición ocho es la que presenta mayor variabilidad, siguiendo en orden decreciente la posición cinco, siete y seis (Andersen y Klungland, 1993; Powell et al., 1996).

En protocordados las dos variantes encontradas muestran un 60 % de homología con respecto a mGnRH. Sin embargo la presencia de Cys en la secuencia de tllGnRH posibilita que esta variante se presente en forma dimérica, siendo cada homodímero un decapeptido con las características enunciadas precedentemente (Powell et al., 1996).

Sin embargo, esta familia de neuropéptidos no parece estar limitada a estas once variantes estructurales ya que existen evidencias acerca de la presencia de formas aún no secuenciadas en vertebrados (King et al., 1992; Dellovade et al., 1993; Stefano et al., 1995).

I.1. Estructura de la molécula precursora de GnRH

La estructura del precursor (denominado prepro-GnRH) sigue un esquema común al conocido para otros neuropéptidos (Hormona liberadora de hormona de crecimiento, GHRH, y vasotocina). GnRH se encuentra formando parte de una larga proteína precursora en cuyo extremo amino terminal está precedida por un péptido señal y en el carboxilo terminal presenta una secuencia característica de amidación enzimática (Gly-Lys-Arg), seguido por un péptido al cual se denominó: péptido asociado a GnRH (GnRH Associated Peptide o GAP) (Sherwood et al, 1993).

La molécula madura es generada por procesamiento enzimático durante el cual son removidos ambos extremos amino (péptido señal) y carboxilo terminal (GAP) (Mayo et al., 1983; Heierhorst et al., 1989; Seeburg et al., 1989). A su vez, GnRH sufre un procesamiento postraducciona, que involucra la formación de un residuo piroglutámico a partir de la glutamina en el extremo amino terminal, y la adición de un grupo amino en el extremo carboxilo terminal aparentemente cedido por una glicina.

La secuencia codificante del ADN (ADNc) de GnRH fue determinada inicialmente en algunas especies de mamíferos: humano, ratón y rata (Seeburg and Adelman, 1984; Adelman et al, 1986; Mason et al., 1986) (Figura 1). Subsecuentemente fueron aislados clones de ADNc que codifican para diversos prepro-GnRHs: precursor de sGnRH (Bond et al, 1991; Klungland et al, 1992; Suzuki et al, 1992), precursor de clGnRH (Dunn et al, 1993), precursor de clIGnRH (Bogerd et al, 1994; White et al, 1994), precursor de cfGnRH (Bogerd et al, 1994) y precursor de sbGnRH (Gothilf et al., 1996), teniendo todas ellas la misma estructura general.

Todos los genes codificantes para prepro-GnRH presentan la misma estructura modular, que comprende cuatro exones. El primer exón codifica para la región 5' no transcrita. El segundo codifica para un péptido señal de 21-23 aminoácidos, GnRH, un sitio de procesamiento proteolítico y los primeros 11 aminoácidos de un péptido asociado a GnRH (GAP). El tercer exón codifica para lo que resta del GAP (aa 12-43) y el cuarto codifica para los aminoácidos restantes y la región 3' no transcrita (Klungland et al, 1992a; Adelman et al, 1986; Mason et al, 1986a; Dunnet et al, 1992). Esta estructura molecular tan conservada sugeriría que estos genes tendrían un origen ancestral común.

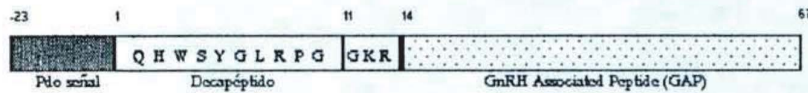


Figura N°1: Estructura del precursor de mGnRH

I.2. Distribución Taxonómica y probables funciones de GnRH en vertebrados

Existen evidencias acerca de la presencia de más de una variante molecular de GnRH en vertebrados gnatostomados: en general cII GnRH y una segunda forma que varía entre las distintas especies. En peces cartilaginosos esta segunda variante es dfGnRH y una nueva variante aún no identificada (Powell et al., 1986a; Sherwood, 1987; Lovejoy et al., 1991a, 1992, 1993). En peces óscos, se presenta conjuntamente con una segunda o tercer forma: mGnRH, sGnRH, cfGnRH, sbGnRH o variantes aún no caracterizadas (Powell et al., 1986a; Yu et al., 1988; Sherwood and Lovejoy., 1989; Sherwood et al., 1983; 1984; 1989 and 1991; King et al., 1990b; Okuzawa et al., 1990; Amano et al., 1992; Ngamvongchon et al., 1992; King and Millar., 1985; Gothilf et al, 1995; Stefano et al, 1997).

En la mayoría de las especies de anfibios estudiadas se observó además de cII GnRH, mGnRH y una especie aún no identificada con propiedades cromatográficas e inmunológicas similares a sGnRH (King and Millar., 1986; Sherwood et al., 1986b; Conlon et al., 1993; King et al., 1994; Somoza et al., 1996).

Entre los reptiles cII GnRH aparece junto con cI GnRH y en algunas especies existe evidencia acerca de la presencia de una tercer forma aún no identificada (Powell et al., 1985 and 1986b; Sherwood and Whittier., 1988; Lovejoy et al., 1991b; Tsai and Licht., 1993).

Un caso similar ocurre en aves, donde generalmente se expresan cI GnRH y cII GnRH (King and Millar., 1982a and 1982b; Miyamoto et al., 1983 and 1984; Powell et al., 1987; Mikami et al., 1988; Sherwood et al., 1988).

En mamíferos se han identificado dos formas moleculares de GnRH: mGnRH y cIIGnRH. En varias especies de metaterios (King et al., 1989; 1990) y en algunas especies de euterios que evolucionaron tempranamente como los insectívoros (Dellovade et al., 1993) están presentes cIIGnRH y mGnRH, mientras que en la mayoría de las especies de euterios más evolucionados ha sido identificada solamente mGnRH (King et al., 1988; Kelsall et al., 1990; Gautron et al., 1991).

Por otro lado, LIgNnRH y LIIIGnRH, son variantes que se encuentran restringidas al grupo de ciclóstomos (agnatha), donde hasta el momento no se ha observado la presencia de cIIGnRH. Ver tabla II.

	m	cl	s	cII	LI	LII	df	cf	sb	ND
AGNATOS					x	x				x
CONDRICTIOS				x			x			x
OSTEICTIOS	x		x	x				x	x	x
ANFIBIOS	x			x						x
REPTILES		x		x						x
AVES		x		x						
MAMIFEROS	x			x						x

*

Tabla II Distribución taxonómica de GnRH en vertebrados (King & Millar, 1995)

m: mGnRH, cl: cIIGnRH, s: sGnRH, cII: cIIIGnRH, LI: LIIGnRH, LII: LIIIGnRH, df: dfGnRH, cf: cfGnRH, sb: sbGnRH, ND: no determinado.

Segun Muske (1993), la expresión de las distintas variantes moleculares de GnRH en vertebrados gnathostomados, se debería a la presencia de dos grandes sistemas GnRHérgicos (sistema anterior y sistema posterior), que tendrían un origen embriológico distinto, y se proyectarían a distintos blancos.

El sistema anterior (también denominado nervio terminal-septo-preóptica), se encuentra involucrado en la regulación de la liberación de gonadotrofinas en la mayoría de los vertebrados. Sus neuronas se originarían en la placoda olfatoria embrionaria, y migrarían centralmente durante el desarrollo. El sistema posterior (también llamado cerebro medio y diencefalo posterior), menos estudiado, tendría un origen embrionario diferente (hasta el momento desconocido) y expresaría cII GnRH. Cada vez existen más evidencias que comprueban la presencia de estos dos sistemas.

En la mayoría de los vertebrados la variante expresada por el sistema anterior varía entre las distintas especies y regula la liberación de gonadotrofinas hipofisarias. Por otro lado cII GnRH, que prevalece en áreas extrahipotalámicas y probablemente en el Sistema Nervioso Periférico (SNP), podría asumir el rol de neurotransmisor o neuromodulador aunque su función no se encuentra bien determinada.

En aves, anfibios y peces óseos, cII GnRH predomina en regiones del cerebro extrahipotalámicas, mientras la segunda forma (cI GnRH, sGnRH, o mGnRH) prevalece en hipotálamo (Mikami et al., 1988; Yu et al., 1988; Katz et al., 1990; King et al., 1990b; Okuzawa et al., 1990; Sharp et al., 1990). Sorprendentemente la concentración de cII GnRH es elevada en la médula de varias especies de aves, anfibios y teleósteos estudiados, sugiriendo un rol específico para cII GnRH en esta región. En aves, cII GnRH afecta en el comportamiento reproductivo, con probable participación en la inducción del comportamiento de cortejo. (Silver et al., 1992).

Debido a la diferente localización de las dos (o tres) formas moleculares de GnRH (Mikami et al, 1988; Yu et al, 1988; Katz et al, 1990; Sharp et al, 1990), la localización de receptores en el cerebro de distintas especies y la variación de la cantidad de alguna de ellas en función de la edad o el estadio de maduración sexual, se infirió que GnRH podría poseer, además de la clásica función como regulador de la síntesis y secreción de gonadotrofinas hipofisarias, otras funciones adicionales (Ver Hsueh et al, 1985)

GnRH actuaría como neurotransmisor y neuromodulador dentro del Sistema Nervioso Central (SNC) (King and Millar, 1987; 1992), mientras que fuera del mismo, GnRH tendría efectos parácrinos sobre las gónadas, donde afectaría la producción de hormonas esteroideas y sobre la placenta, donde estimularía la secreción de gonadotrofina coriónica (CG) (Hsueh and schaeffer, 1985; Paty and Habibi, 1993)).

Por otra parte podría tener efectos regulatorios autócrinos en células tumorales de mamas teniendo en cuenta las siguientes evidencias: allí se expresa el gen de GnRH (Harris et al., 1991), están presentes receptores para GnRH (Eidne et al., 1987) y antagonistas a GnRH inhiben el crecimiento celular (Eidne et al., 1987)

Estudios in-vitro de la actividad biológica de las distintas variantes, revelaron que en ganglio simpático de la rana toro, cII GnRH es cien veces más potente que sGnRH y al menos mil veces más potente que otras variantes de GnRH, en mediar el potencial postsináptico, ubicándolo como principal candidato para neurotransmisor endógeno. (Jones, 1987).

La especificidad de acción de GnRH en los diferentes tejidos estaría dada por particulares arreglos anatómicos, que permiten su acción a través de distancias limitadas, la utilización de las diversas variantes moleculares de GnRH y sus receptores específicos para las distintas funciones. Por ejemplo en anfibios los receptores hipofisarios tienen alta afinidad para todas las formas de GnRH, mientras el receptor de ganglio simpático es altamente específico para cII GnRH (King et al, 1995).

1.3. Evolución de las múltiples formas de GnRH

El factor de apareamiento α de levaduras (α mating factor) se considera una forma ancestral de GnRH que precede a la aparición de vertebrados (Kurjan and Herskowitz, 1982). Este tiene homología de secuencia con GnRH de vertebrados, se une específicamente a receptores de GnRH de hipófisis y estimula la liberación de LH en rata. (Loumaye et al., 1982).

Como se ha mencionado precedentemente, en protocordados recientemente se han secuenciado dos variantes de GnRH (tI GnRH y tII GnRH) y según los resultados arrojados por estudios de inmunocitoquímica se sugiere que previo a la evolución de la hipófisis en vertebrados, las neuronas GnRHérgicas habrían liberado su secreción directamente al torrente sanguíneo con la posibilidad de que la hormona actúe directamente sobre las gónadas (concepto avalado por la presencia de receptores para GnRH en las gónadas de vertebrados) (Powell et al., 1996).

Para evaluar la aparición de las diferentes formas moleculares de GnRH entre los vertebrados fueron propuestos varios esquemas evolutivos basados en la estructura primaria y la distribución filogenética de las variantes. En estos esquemas, cII GnRH cumple un rol importante debido a su amplia distribución y conservación. Esta forma ha podido sufrir duplicación génica y divergencia de su secuencia para dar lugar a las demás variantes de GnRH. Sin embargo la relación entre cII GnRH y la hipotética forma ancestral, así como las variantes aisladas de los primitivos agnatos, permanece aún desconocida. Sin embargo, los esquemas evolutivos planteados, están sujetos a continuos cambios originados con la identificación de nuevas formas moleculares

1.4. Modelo experimental

El armadillo *Chaetophractus villosus*, es un mamífero euterio perteneciente al orden *Xenarthra* (o *Edentata*) (Wetzel., 1985). Los especímenes pertenecientes a este grupo, presentan un gran número de características, que se podrían considerar primitivas: temperatura corporal relativamente inferior a otros mamíferos, pobre habilidad para regular la temperatura, testículos intrabdominales, etc, por lo que este orden es considerado como uno de los más primitivos entre los mamíferos euterios (Engelmann., 1985) y habría radiado a partir de los primitivos insectívoros (Colbert., 1969).

Por otro lado, se sabe que cII GnRH se encuentra ampliamente distribuída en la mayor parte de los vertebrados, incluyendo peces cartilaginosos, teleósteos, anfibios, reptiles y aves. A su vez, la expresión de cII GnRH también ocurre en mamíferos metaterios y euterios tempranamente evolucionados (como los insectívoros), no encontrándose evidencias de la expresión de cII GnRH en especies de euterios más evolucionados.

Considerando toda esta información, queda claro que el grupo de los edentados, habiendo radiado tempranamente a partir de los insectívoros puede servir como modelo experimental para estudiar la evolución de los sistemas GnRHérgicos.

Los objetivos del presente trabajo son:

- Identificar las variantes moleculares presentes en el encéfalo del armadillo.
- Verificar la presencia de cII GnRH.
- Determinar si existe una distribución diferencial de las formas moleculares de GnRH en distintas áreas del encéfalo.

Debido a la bajísima cantidad de GnRH en el cerebro de los vertebrados, el aislamiento y secuenciación no siempre son practicables. Por esta razón se ha utilizado un estudio indirecto que conjuga a la cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC) como método de separación y radioinmunoanálisis (RIA) con antisueros específicos, para identificar las distintas variantes moleculares de GnRH. A pesar de que este tipo de estudios no provee evidencias concluyentes para caracterizar a GnRH y el análisis final concluye con la determinación de la secuencia, este sistema ya ha sido validado por otros laboratorios que han predicho la estructura de cI GnRH en material no totalmente purificado (King & Millar, 1982a) para luego confirmar su estructura mediante secuenciación (King & Millar 1982b).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Animales y Técnica Quirúrgica

Se utilizaron cinco armadillos hembras *Chaetophractus villosus*, sexualmente maduros, con un peso que osciló entre 3.5 y 5 Kg, capturados en las proximidades de Azul (Prov. de Bs. As.). Estos animales se mantuvieron en la colonia de edentados del Instituto de Neurociencia, se sometieron a un fotoperíodo natural y se alimentaron con alimento balanceado y agua ad-libitum.

Los animales se anestesiaron con Clorhidrato de ketamina (40 mg/ Kg. im) y tiopental sódico (60 mg/kg. ip). Evitando sufrimientos innecesarios al animal se extrajo el encéfalo de cada uno. Este se disecó inmediatamente a 4°C en las siguientes áreas: ♦ Bulbo olfatorio ♦ Neocortex ♦ Preóptica-Hipotalámica ♦ Hipocampo ♦ Mesencéfalo-Tectum óptico y ♦ Cerebelo.

Cada región proveniente de los distintos armadillos se agrupó conformando un lote, luego se pesó y mantuvo a -70°C hasta su posterior utilización.

AREA (lote)	(n=5)	grs.
Bulbo olfatorio		5.56
Neocortex		6.31
Preóptica-Hipotalámica		4.65
Hipocampo		4.22
Mesencéfalo-Tectun óptico		3
Cerebelo		11.68

Tabla III: Pesos registrados para los distintos lotes

II.2. Extracción

Se utilizó el protocolo de extracción descrito por Sherwood et al (1986b), Yu et al (1988). Brevemente, cada lote se homogeneizó en Acetona: HCl 1N (100:3 v/v; 5 ml por gr. de tejido) a 4 °C con un homogeneizador del tipo ultraturrax, modelo OMNI 5000. Los homogenatos se agitaron a 4 °C durante 3 hs y se filtraron por papel Whatman N°1. El material no soluble se reextrajo en Acetona: HCl 0.01N (80:20 v/v, en un cuarto del volumen inicial) durante 5 minutos con agitación constante y se filtró en las mismas condiciones anteriores.

Ambos extractos se combinaron y trataron con eter de petróleo, con el objeto de remover la acetona, lípidos y otras sustancias hidrofóbicas presentes. Para ello se colocó en una ampolla de decantación, el volumen filtrado y un volumen cuatro veces mayor de eter de petróleo, se dejó estabilizar el sistema y se extrajo la fase acuosa a 4 °C; Esto se repitió cinco veces. Posteriormente, cada lote se concentró en un evaporador rotatorio hasta un volumen aproximado a 1 ml y se congeló a -70 °C hasta su posterior utilización.

II.3. Separación por Cromatografía Líquida de Alta Presión de Fase Reversa (RP-HPLC)

La cromatografía se realizó en un cromatógrafo líquido LKB, programado bajo condiciones previamente establecidas por Sherwood et al (1986b). Los extractos de tejido se filtraron con un filtro millipore HA de 0.45 µm y se inyectaron a través de un loop de 1 ml en una columna Lichrospher 100 RP18 (fase reversa) (de 0.46 × 25 cm, tamaño de partícula 5 µm , Merck) con precolumna C-18.

La fase móvil utilizada inicialmente fue 17 % Acetonitrilo en TEAF (Acido fórmico 0.25 M ajustado a pH 6.5 con Trietilamina), **solución A** y 24 % Acetonitrilo en TEAF, **solución B**. La elución comenzó con un período isocrático de 10 minutos de fase móvil A. Este luego se incrementó linealmente hasta un 24 % de Acetonitrilo por un período de 7 minutos , a partir del cual se trabajó isocráticamente. El flujo de la fase móvil se ajustó a 1 ml/ minuto durante todo el ensayo, la corrida se detuvo a los 70 minutos y se recolectaron fracciones de 1 ml.

Cada cromatografía del extracto de tejido fue precedida por una corrida denominada **Blanco** en la que sólo se inyectó fase A. Esto se realizó para tomar en cuenta cualquier posible contaminación de la columna con trazas de GnRH. Estas fracciones se ensayaron por radioinmunoanálisis (RIA) con el fin de detectar la posible presencia de material inmunoreactivo. Si se hubieran encontrado valores detectables de ir-GnRH, se hubieran restado a las fracciones correspondientes en la cromatografía de los distintos extractos de tejido, pero este no fue nuestro caso.

Luego de cada cromatografía de extracto de tejido se inyectó una mezcla de estándares sintéticos de distintas variantes de GnRH: mGnRH, cIGnRH, cIIGnRH y sGnRH (300 ng de c/u por ml de fase A). La detección para determinar la posición de elución de las distintas variantes moleculares, se realizó por Absorbancia a 280 nm. Ver figura 2

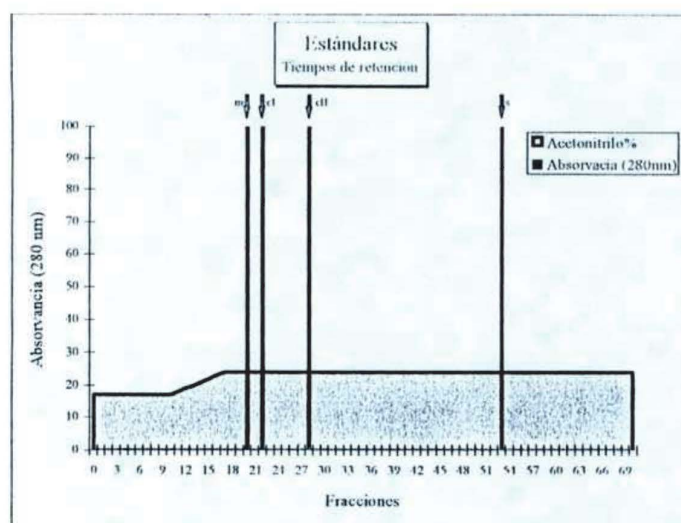


Figura N°2: esquema de separación de una mezcla de estandares detectados por UV. Las flechas indican los tiempos de retención (minutos) verificados para las distintas variantes. m: mGnRH, cl: clGnRH, cll: clIGnRH, s: sGnRH.

II.4. Radioinmunoanálisis (RIA)

Las fracciones obtenidas del RP-HPLC de los extractos de las distintas áreas se liofilizaron y resuspendieron en 1 ml de buffer para RIA (buffer Fosfato 0.05 M, NaCl 0.15 M, EDTA 0.01 M, Azida sódica 0.015 M, pH 7.5 y 0.5 % BSA) para estudiar la inmunoreactividad a GnRH (ir-GnRH) en estas fracciones bajo condiciones previamente validadas (Somoza et al, 1994).

Para ello 100 µl de estandar sintético o de muestra se diluyeron con buffer para RIA (hasta alcanzar un volumen de 300 µl). Se adicionó 100 µl de hormona iodinada (^{125}I , aproximadamente 12000 cpm) en cada tubo, 100µl de antisuero y se incubó durante 48 hs a 4 °C .

Cada ensayo presentaba los siguientes tubos:

- CUENTAS TOTALES: 100µl de estandar iodinado.
- UNION INESPECIFICA (NsB): 400µl de buffer y 100µl de ^{125}I -GnRH
- MAXIMA PEGADA (MxB): 300µl de buffer, 100µl de antisuero y 100µl de ^{125}I -GnRH.
- CURVA ESTANDAR: diluciones seriadas al medio a partir de una concentración del estandar GnRH de 500pg/100µl hasta alcanzar una concentración de 0.5 pg/100µl.

Pasado el tiempo de incubación se separó la fracción de hormona libre de la unida de la siguiente forma: se agregó 1.5 ml de Etanol (4° C) a cada tubo (se dejó decantar unos minutos) y se centrifugó a 1500 g durante 25 minutos a 4 °C . El sobrenadante se descartó por aspiración y se midió la radioactividad en el precipitado con un contador gamma.

Como primera aproximación se utilizaron tres sistemas de RIA distintos utilizando antisueros desarrollados contra GnRH y que presentan reactividad cruzada frente a todas las variantes de la hormona identificadas hasta el momento.(Tabla IV)

A/S	Título	^{125}I -H	STD	m (%)	cl(%)	cII(%)	s(%)	LI(%)	cf(%)	df(%)	LIH%
PBL#45	1:15.10 ⁴	sGnRH	sGnRH	100	133.3	25.9	100	24	ND	1.58	ND
PBL#49	1:25.10 ³	sGnRH	sGnRH	93.3	333.3	32.6	100	2	ND	4.59	ND
cII678	1:40.10 ³	mGnRH	mGnRH	100	416	81	437	3	36	36	ND

Tabla V: Porcentaje de reactividad cruzada con otras variantes de GnRH en los distintos sistemas de RIA utilizados.

Los antisueros PBL # 45 y PBL#49, gentilmente cedidos por el Dr Wilie Vale, (The Salk institute. The Clayton Foundation Laboratories for peptide Biology), se desarrollaron en conejo contra [Lis (8) GnRH] o contra sGnRH respectivamente. cII678, gentilmente cedido por la Dra Judy King (University of Cape Town Medical School, Cape Town, Sud Africa.), se generó en conejos contra cIIGnRH.

De acuerdo con este primer análisis, se infirió la identidad molecular de la hormona presente, de acuerdo a la correspondencia entre la ir-GnRH y la posición de elución de las distintas variantes de GnRH verificadas por la cromatografía de los estándares sintéticos. Posteriormente aquellas fracciones que mostraban mayor ir-GnRH se analizaron por ensayos de diluciones seriadas con sistemas de RIA homólogos para las variantes cuya presencia se suponía. Las pendientes de las curvas de desplazamiento fueron comparadas con las obtenidas con el estándar y estudiadas por un análisis de varianza..

Para esto se utilizaron dos antisueros específicos contra GnRH en un sistema de RIA homólogo para mGnRH (Tabla VI)

A/S	Título	¹²⁵ I-H	STD	m(%)	cl(%)	cII(%)	s(%)	LI(%)	cf(%)	df(%)	LIII%
m1076	1:5.10 ⁴	mGnRH	mGnRH	100	17.7	0.11	0.01	<0.01	ND	ND	ND
EL-15	1:175.1 0 ³	mGnRH	mGnRH	100	0.002 8	<0.01	<0.01	0.048	ND	ND	ND

Tabla VI: Porcentaje de reactividad cruzada de los antisueros con otras variantes de GnRH en los distintos sistemas de RIA utilizados.

El antisuero m-1076, gentilmente cedido por la Dra Judy King, y el antisuero EL-15, gentilmente cedido por el Dr. W. Ellinwood, (Oregon Health Sciences University), se desarrollaron ambos en conejo contra mGnRH.

La linealización de la curva (B/B_0) en función de la concentración del estandar GnRH se obtuvo con la transformación Logit B/B_0 para la respuesta y Logaritmo decimal para la concentración. Se estudió el paralelismo de las rectas estandar y del extracto, con un análisis de varianza.

Por otra parte se utilizó un antisuero específico para cIIGnRH con el objeto de analizar la posible existencia de cIIGnRH en los distintos extractos de tejido. Este antisuero cII675 (cedido gentilmente por la Dra Judy King) posee las siguientes características en un sistema que utiliza cIIGnRH como estandar y molécula marcada:

mGnRH: <0.01%, cIGnRH: <0.01%, cIIGnRH: 100%, sGnRH: 3%, LIGnRH: <0.015, cfGnRH: ND, dfGnRH: ND, LIIIGnRH: ND.

II.5. Radioiodinación

II.5.1.sGnRH y cIIGnRH

La marcación se realizó utilizando el protocolo de Yu et al, (1987) con ligeras modificaciones. Se mezclaron 10 μ l de GnRH sintético (5 μ g de sGnRH o cIIGnRH en Acido acético 0.1 N) con 5 μ l de 125 INa (1mci) en 5 μ l de buffer fosfato 0.5 M. La reacción comenzó con el agregado de 10 μ l de Cloramina T (2.2mM en buffer fosfato 0.05 M pH 7.5) y se dejó reaccionar durante 2 minutos para sGnRH y 1 minuto para cIIGnRH.

Para separar la hormona marcada y el ^{125}I libre, se sembró inmediatamente esta mezcla de reacción en una columna de intercambio catiónico de carboximetilcelulosa (CMC) de 6 x 0.6 equilibrada en acetato de amonio 2mM (la reacción finalizó por dilución). Con este mismo buffer, se eluyeron los primeros cinco tubos y luego se aumentó la fuerza iónica eluyendo con 100 mM para sGnRH o 200mM para cIIGnRH. El eluido se recogió en tubos que contenían 300 μl de Acetato de amonio 2 mM, BSA 5% y se recolectaron 16 tubos con un volumen final de 3 ml cada uno.

II.5.2.mGnRH

En este caso se utilizó un protocolo diseñado por Judy King (comunicación personal). Se mezclaron 10 μl de mGnRH sintético (5 μg en Acético 0.1 N) con 5 μl de $^{125}\text{I}\text{Na}$ (1 mCi) en 35 μl de buffer fosfato 0.5 M pH 7.6. La reacción comenzó con el agregado de 10 μl de Cloramina T (0.21 M en buffer fosfato 0.05 M pH 7.6). Se agitó e inmediatamente se frenó la reacción con 20 μl de metabisulfito de sodio (16 mg/20 ml buffer fosfato 0.05 M pH 7.6). Los demás pasos fueron similares a los seguidos para la marcación de cIIGnRH.

En cada caso las fracciones se ensayaron por RIA para la determinación de máxima pegada (MxB). Luego se seleccionaron aquellas fracciones que presentaban una pegada $\geq 20\%$ y constituyendo un "pool". Para verificar si la hormona iodinada y la fría competían de forma similar frente al antisuero se realizó un ensayo de desplazamiento de GnRH. Para tal fin, se realizó una curva de GnRH frío que comprendía un rango de 0.5-500 pg/100 μl de hormona con diluciones al medio intermedias. Esto se incubó con una cantidad constante de ^{125}I -GnRH

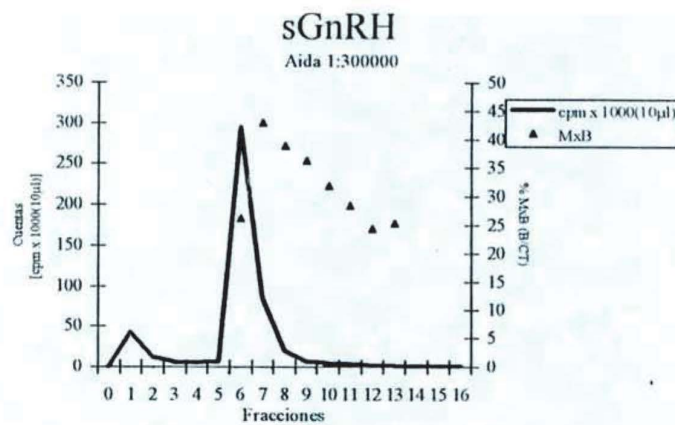


Figura N°3: marcación de sGnRH

Se testearon por RIA los tubos 6-13 para la determinación del MxB con anti sGnRH N°2 (aida), utilizado en una dilución final 1:300000 (antisuero específico para sGnRH) (Okuzawa et al, 1990). De éstos, sólo las fracciones 7-11 presentan una pegada mayor al 20%

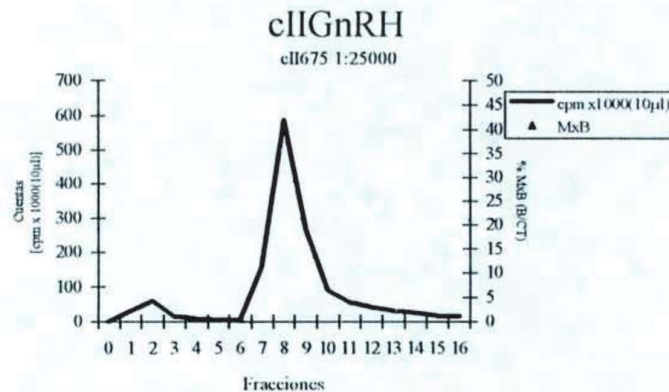


Figura n°4: marcación de cII GnRH:

Se testearon por RIA los tubos 6-17 para la determinación del MxB con cII675, utilizado en una dilución final 1:25000 (antisuero específico para cII GnRH). Los resultados arrojados por el ensayo mostraban una pegada baja, por lo que fusionamos las fracciones 9-13, y realizamos curvas de desplazamiento con distintas diluciones del antisuero

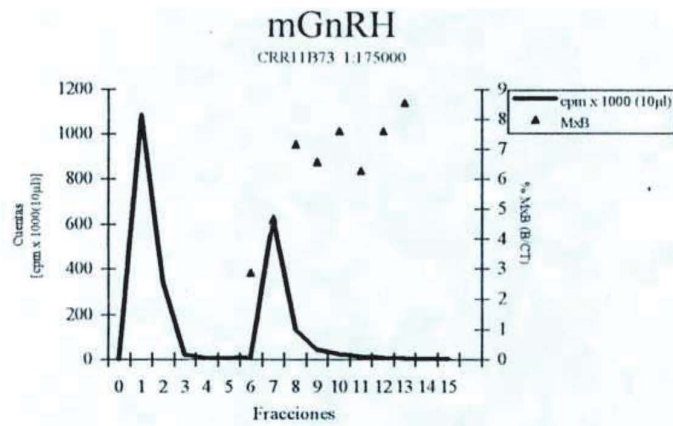


Figura N°5: marcación de mGnRH:

Se analizaron por RIA los tubos 6-13 para la determinación del MxB y se juntaron los tubos 8-12 en un mismo pool.

III. RESULTADOS

La caracterización de ir-mGnRH en extractos de distintas áreas del cerebro del “peludo” se realizó mediante un análisis que combina RP-HPLC y RIAs con diferentes antisueros poliespecíficos y específicos para variantes de GnRH. En todos los lotes analizados se detectó inmunoreactividad a GnRH con características cromatográficas e inmunológicas similares a mGnRH.

En principio, el sistema de RP-HPLC utilizado, permitió separar las variantes de forma conveniente para los objetivos de nuestro trabajo. Considerando las seis cromatografías realizadas con la mezcla de estándares, se determinó los tiempos de retención de cada una de las formas moleculares y se expresaron como la media \pm el error estandar. Los mismos fueron mGnRH: (20.35 \pm 0.45) minutos, cIGnRH: (22.31 \pm 0.46) minutos, cIIIGnRH: (28.13 \pm 0.91) minutos y sGnRH: (51.19 \pm 2.44) minutos.

En la cromatografía realizada con extracto de Bulbos olfatorios, se observó un solo pico inmunoreactivo a GnRH, al ser evaluado con dos sistemas de RIA: PBL#45 y PBL#49 (Tabla IV). El tiempo de elución de este pico ir-mGnRH (fracción 19-20), es similar al tiempo de retención observado para mGnRH sintético (fracción 21) (figura N°6 y 7)

De la misma forma, en la cromatografía del extracto de Areas preóptico-hipotalámicas sólo un pico inmunoreactivo a mGnRH se observó (fracción 17-18) cuando el análisis se realizó con los sistemas PBL#45 y PBL#49 (Tabla IV). En este caso, el pico ir-mGnRH se localizó ligeramente adelante con respecto a mGnRH sintético (fracción 20) (Figura 6 y 7).

En el caso correspondiente la cromatografía de los extractos de Neocortex y Cerebelos, el pico ir-mGnRH (fracciones 21-22 en el caso de neocortex y 19-20 en el caso de cerebelos), coincide con el tiempo de elución verificado para mGnRH sintética (fracción 20) (figura N°6 y 7).

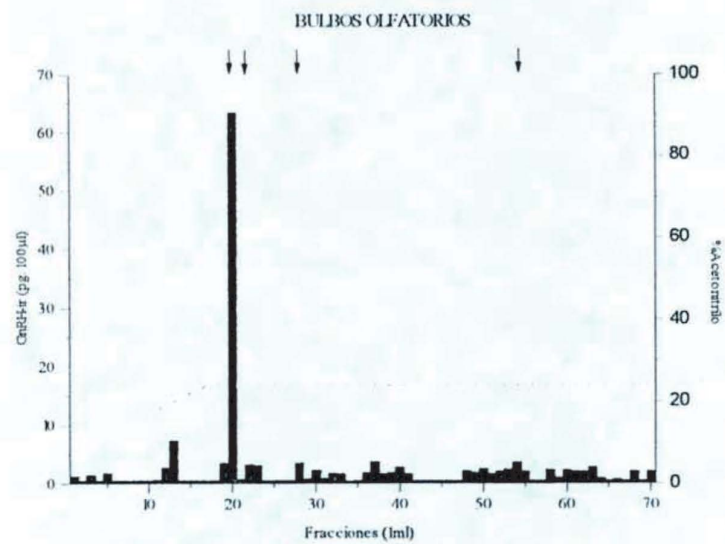
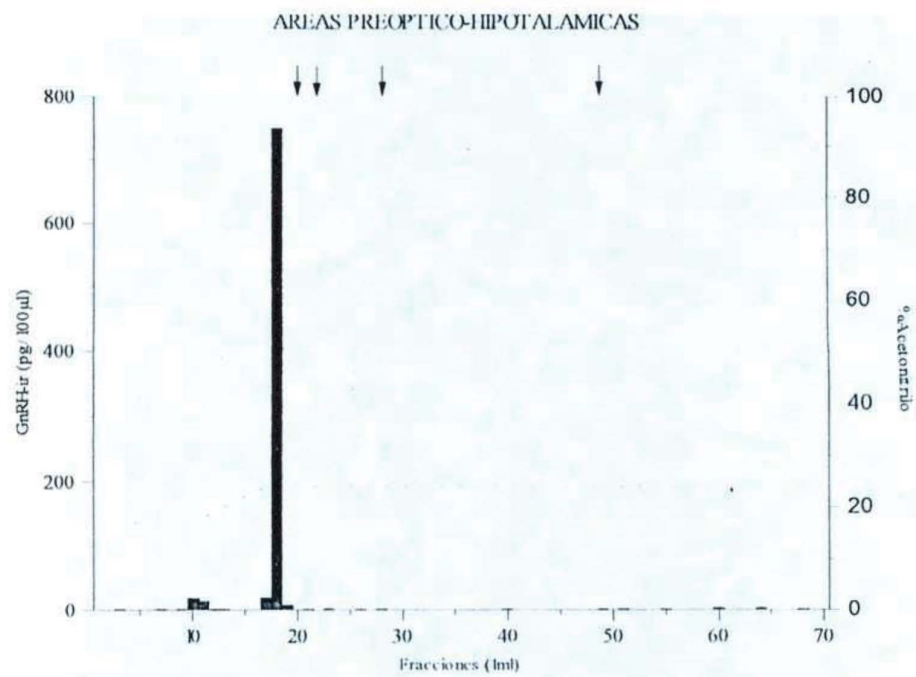
La cromatografía de los extractos de Mesencéfalo (Fig. 6, 7 y 8) e Hipocampo (Fig. 6, 7 y 8) se ensayaron con tres sistemas de RIA: PBL#45, PBL#49, y con cII678. Este último antisuero se utilizó ya que presenta un % de reactividad cruzada mayor respecto a cIIGnRH (81 %) que los otros dos sistemas (Tabla IV). Sin embargo, en todos los casos se observó, un único pico ir-GnRH (fracción 19-20 y fracciones 21-23 para mesencéfalo e hipocampo respectivamente) cuya posición de elución coincidía co la de mGnRH sintético (fracción 20)

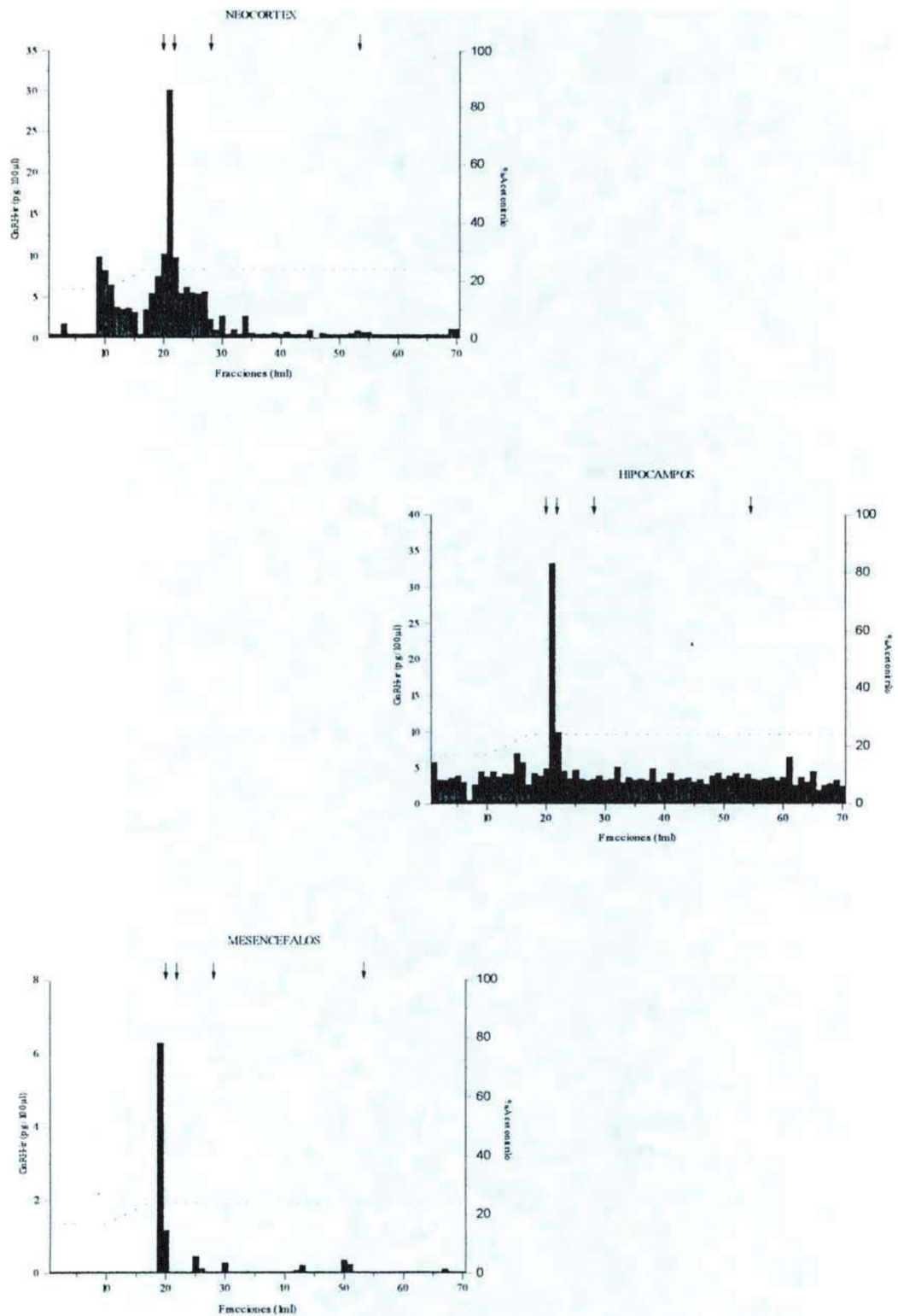
El análisis de las fracciones 23-31 de la cromatografía de los distintos extractos fue posteriormente analizada para verificar la presencia de inmunoreactividad a cIIGnRH (ir-cIIGnRH) con un sistema de RIA específico para cIIGnRH, con el antisuero cII675 (1: 10000) (Ver materiales y métodos). Sin embargo, ninguna de estas fracciones evidenció ir-cIIGnRH (datos no mostrados).

Con el objeto de confirmar los datos obtenidos en los experimentos de RP-HPLC y RIA, se realizaron distintos “pooles” con aquellas fracciones ir-GnRH correspondientes a la cromatografía los distintos lotes

Bulbos olfatorios	fracciones 19-20
preóptico-hipotalámica	fracciones 17-18
hipocampo	fracciones 21-23
Neocortex.	fracciones 21-22
mesencéfalo	fracciones 19-20
cerebelo	fracciones 19-20

Este material se analizó mediante ensayos con diluciones seriadas, utilizando dos sistemas de RIA específicos para mGnRH: m-1076 y EL-15. Cuando se analizó el "pool" obtenido a partir de las fracciones correspondientes al área preóptico-hipotalámica, en ambos casos las curvas obtenidas a partir de las diluciones seriadas de las muestras no fueron estadísticamente diferentes a las obtenidas a partir del estandar sintético. Sin embargo en el caso de los extractos correspondientes a Bulbos olfatorios, Neocortex, Cerebelo, Mesencéfalo e hipocampo, los puntos obtenidos no fueron suficientes como para comparar las curvas de diluciones con el estandar sintético. En estos casos los niveles de ir-mGnRH resultan insuficientes como para desplazar a $^{125}\text{ImGnRH}$ unido al antisuero.





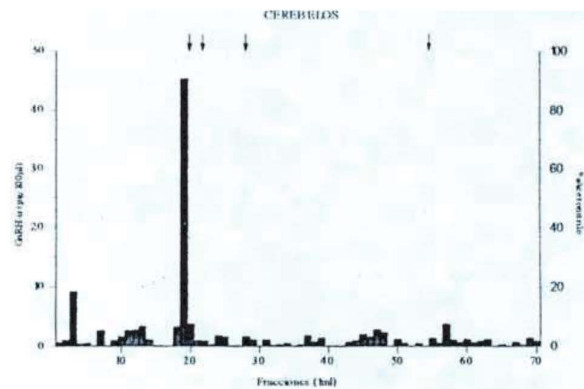
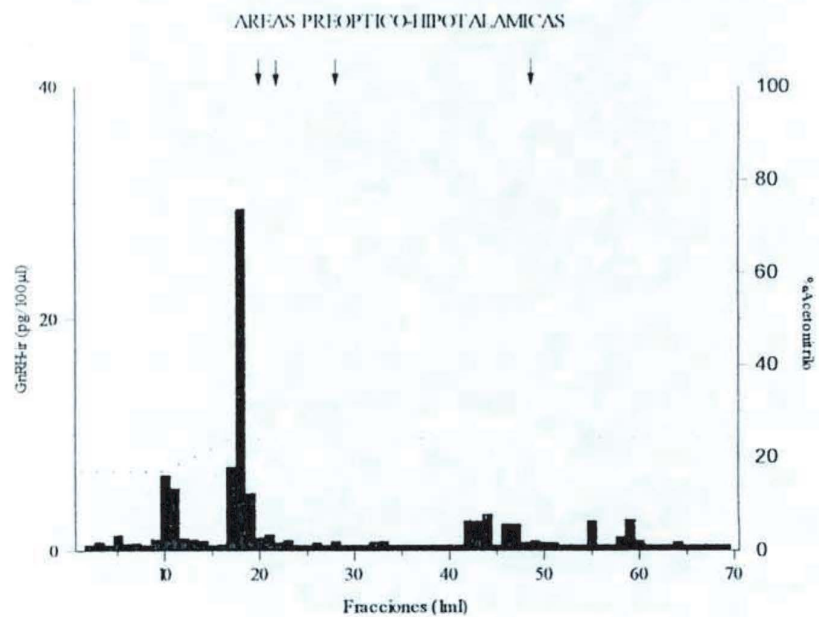
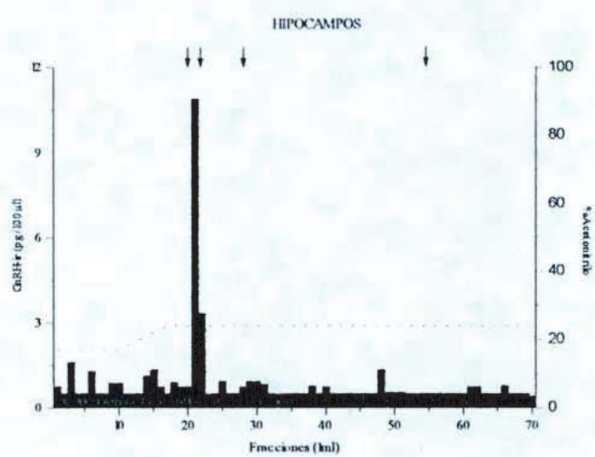
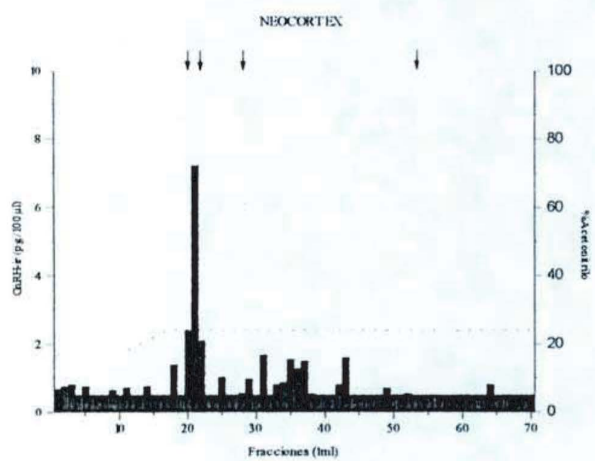
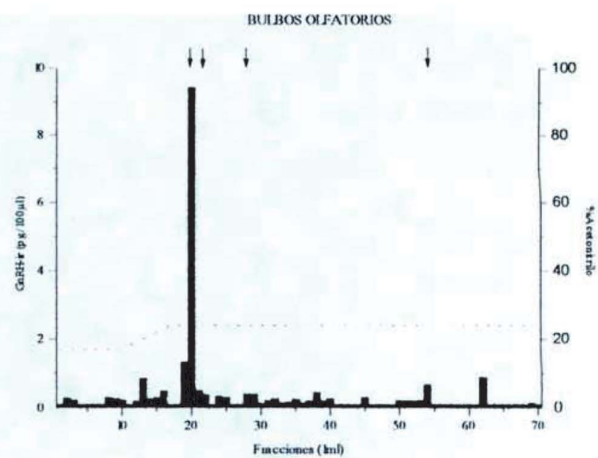


Figura nº 6: presencia de ir-mGnRH en las fracciones de la corrida del RP-HPLC de los distintos extractos, analizado con el antisuero PBL #45 (1: 150000). Las flechas corresponden a los tiempos de retención (min) de mGnRH, cIGnRH, cIIIGnRH y sGnRH respectivamente.





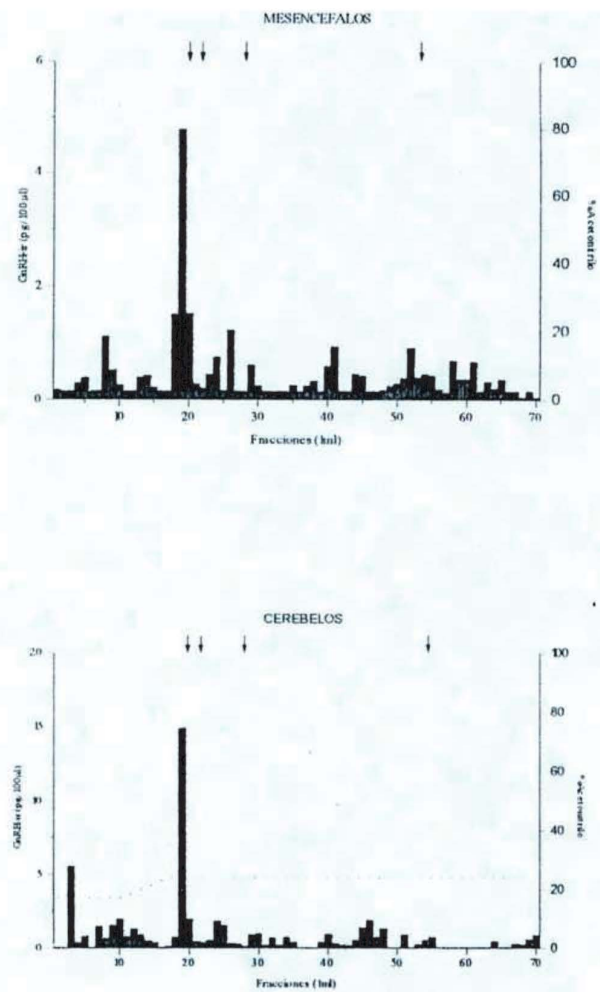


Figura nº 7: presencia de ir-mGnRH en las fracciones de la corrida del RP-HPLC de los distintos extractos, analizado con el antisero PBL #49 (1: 250000). Las flechas corresponden a los tiempos de retención de mGnRH, cI-GnRH, cII-GnRH y sGnRH.

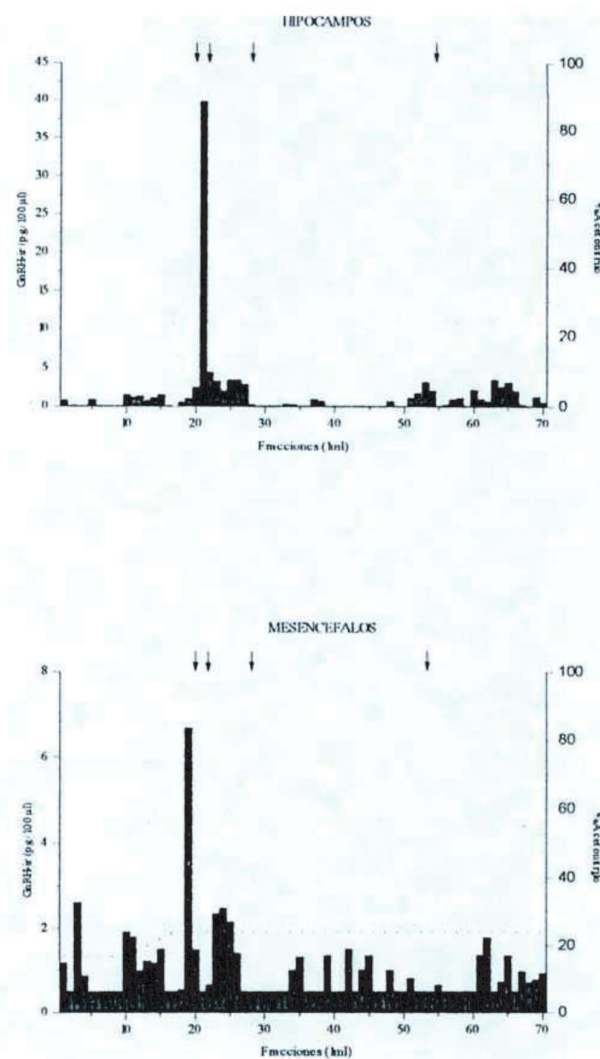
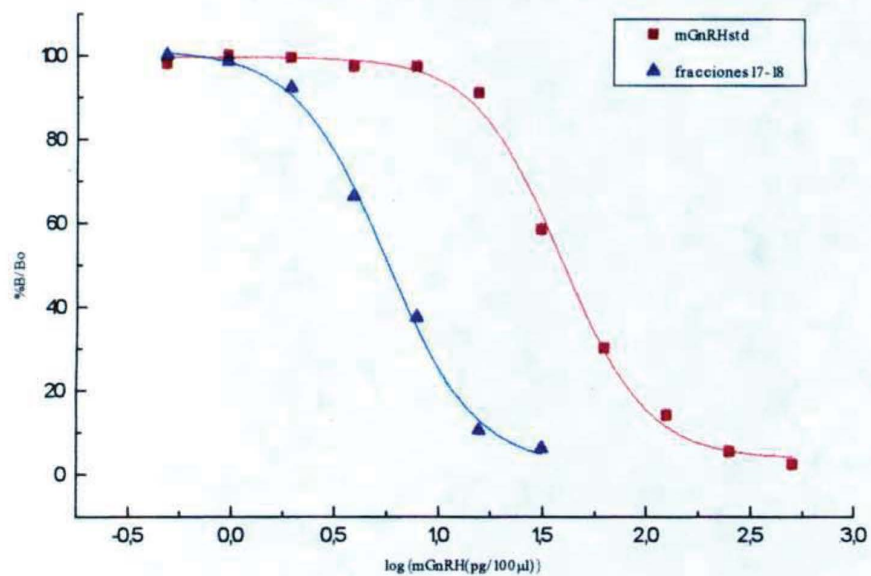
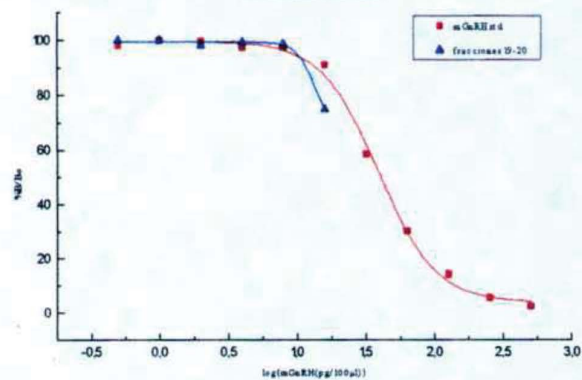


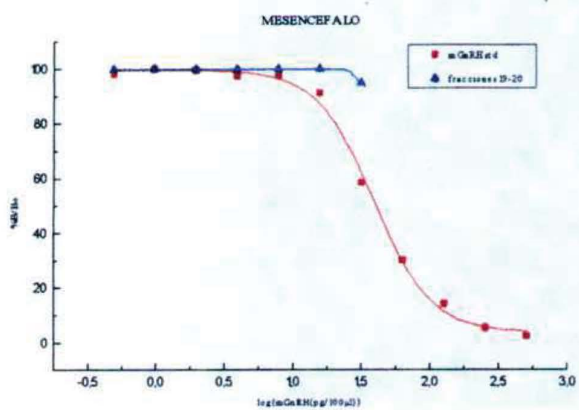
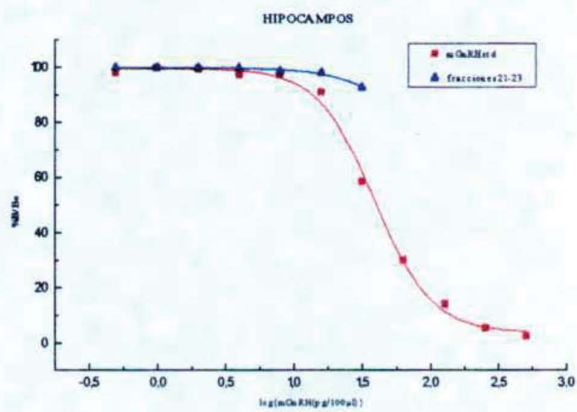
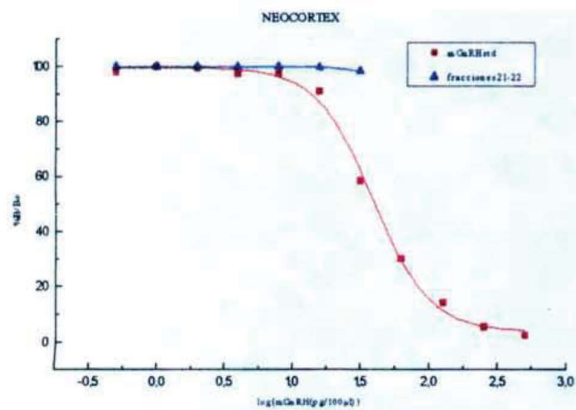
Figura nº 8: presencia de ir-mGnRH en las fracciones de la corrida del RP-HPLC de los extractos de hipocampo y mesencéfalo, analizado con el antisuero cII678 (1:32000). Las flechas indican los tiempos de retención.

AREAS PREOPTICO-HIPOTALAMICA



BULBOSOLFATORIOS





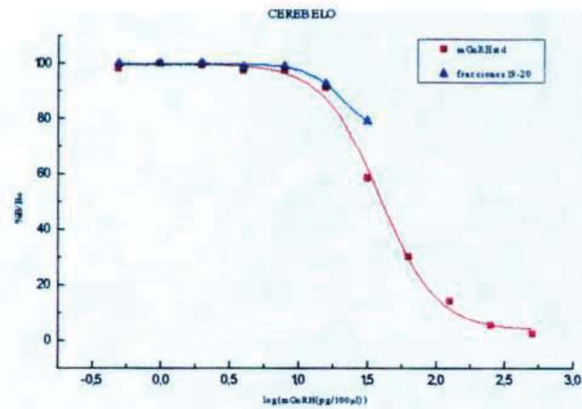
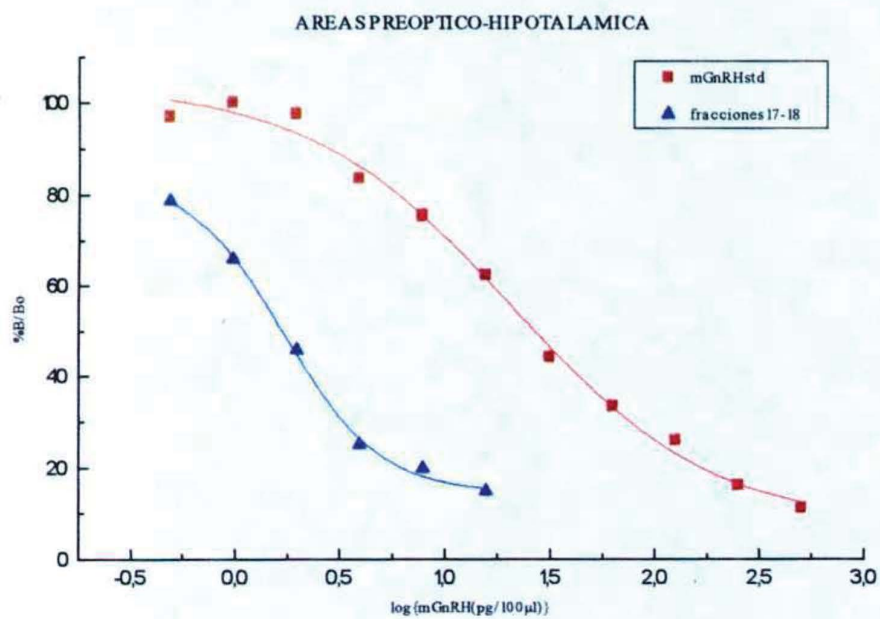
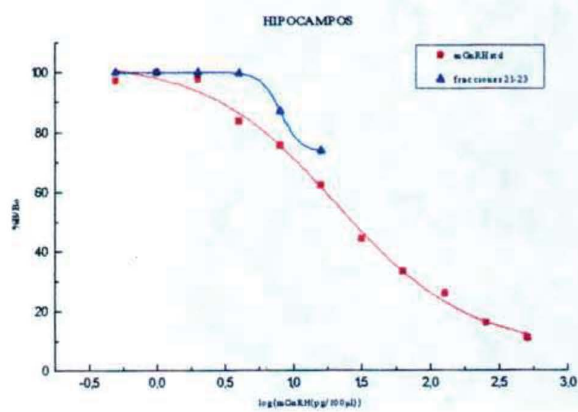
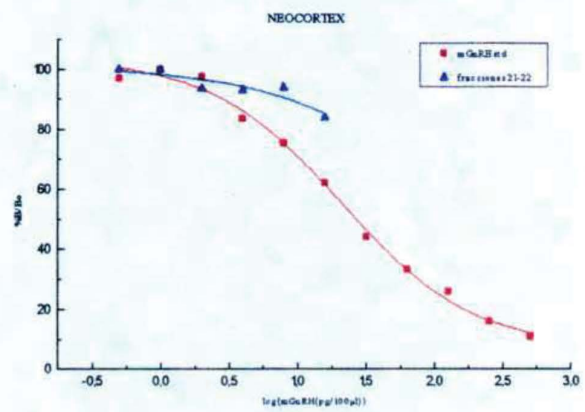
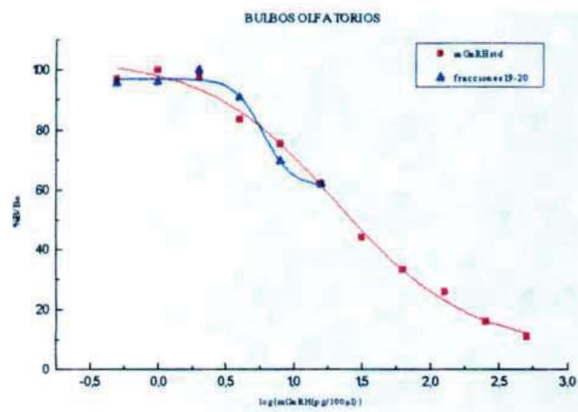


Figura n°9: Desplazamientos comparativos de ^{125}I -mGnRH del antisuero m-1076 (1:50000) por mGnRH sintética en las diluciones seriadas. Cada uno de los puntos de la curva del extracto (de izquierda a derecha), representa una de las siguientes diluciones: 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32.





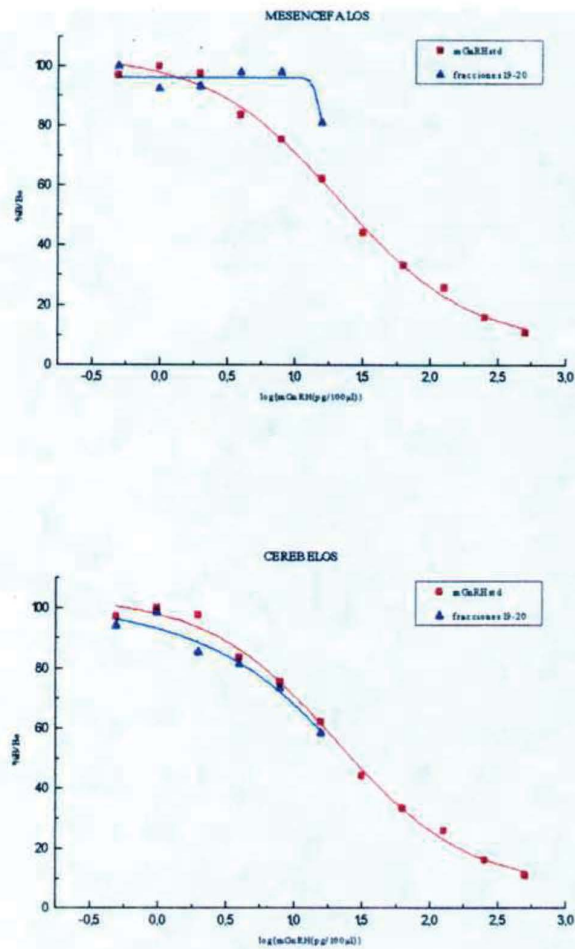


Figura n°10: Desplazamientos comparativos de ^{125}I -mGnRH del antisuero EL-15 (1: 175000) por mGnRH sintética en las diluciones seriadas. Cada uno de los puntos de la curva del extracto (de izquierda a derecha), representa una de las siguientes diluciones: 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32.

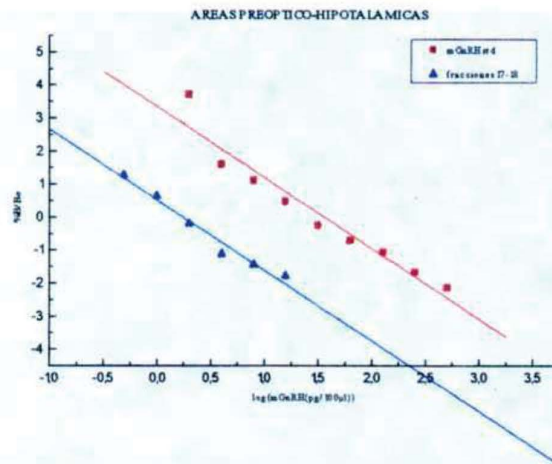


Figura n°11: Linealización de la curva de desplazamientos comparativos de ^{125}I -mGnRH del antisuero EL-15 (1: 175000) por mGnRH sintética en las diluciones seriadas. Cada uno de los puntos de la curva del extracto (de izquierda a derecha), representa una de las siguientes diluciones: 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32 ($F_{1,32}=1.537947$).

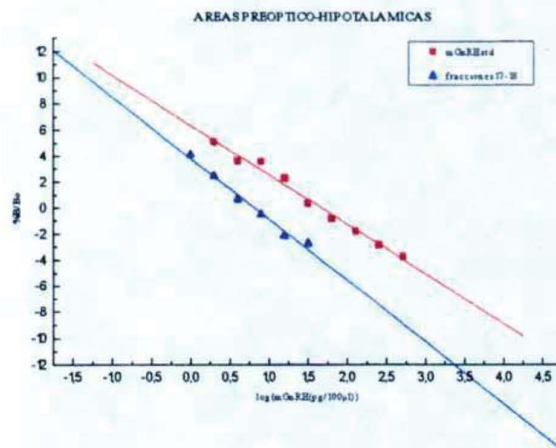


Figura n°12: Linealización de la curva de desplazamientos comparativos de ^{125}I -mGnRH del antisuero m-1076 (1: 50000) por mGnRH sintética en las diluciones seriadas. ($F_{1,32}=1.792427$).

IV. CONCLUSIONES Y DISCUSION

En todos los grupos de vertebrados gnatostomados se ha demostrado la presencia de al menos dos variantes moleculares de GnRH: cII GnRH y una de las ocho variantes identificadas hasta el momento. En mamíferos, esta segunda forma molecular es mGnRH. En varias especies de metaterios : *Thrichosaurus volpecula* (King et al, 1989), *Monodelphis domestica* (King et al, 1990), *Didelphis albiventris* (Somoza & Affanni, datos no publicados), *Dasyurus viverrinus* (King et al, 1989) e *Isodon macrourus* (King et al, 1989) y en especies de euterios tempranamente evolucionados como los insectívoros: *Suncus murinus* (Dellovade et al, 1994), *Chrysocloris asiatica* (King et al, 1994) y *Tupaia glisbelangeri* (Kasten et al, 1996) ambas, cII GnRH y mGnRH están presentes, mientras que en especies de euterios más evolucionados sólo se ha identificado mGnRH.

En este trabajo, investigamos la ocurrencia de estas dos variantes de GnRH en euterios que pertenecen al orden edentata, considerado como uno de los más primitivos entre los mamíferos euterios (Engelmann, 1985), que habría radiado a partir de los insectívoros (Colbert, 1969).

Los resultados del estudio determinaron la presencia de una única variante molecular de GnRH en el encéfalo del armadillo *Chaetophractus villosus*, con propiedades cromatográficas e inmunológicas similares a mGnRH (Figura 6,7 y 8).

Se utilizó un estudio que combina RP-HPLC y RIAs con diferentes antiseros poliespecíficos y específicos para distintas variantes de GnRH. El mismo pone en evidencia la presencia de un único pico inmunoreactivo a GnRH, que co-eluye con el péptido sintético de mamífero (Figura N°6, 7, 8).

Algunas de las fracciones cromatografiadas se reanalizaron en un sistema homólogo para mGnRH, utilizando m-1076 y EL-15, ambos antisueros específicos para mGnRH (Figura 9 y 10). Las curvas de desplazamiento logit-log del extracto de áreas preóptico-hipotalámicas no fueron significativamente diferentes de las obtenidas para mGnRH sintético (Figura 11 y 12), indicando que el extracto de tejido, desplaza al péptido radioactivo unido al antisuero de la misma forma en que lo hace el estandar sintético. Esto sugiere que mGnRH presente en el extracto es inmunológicamente indistinguible del estandar sintético.

Hasta el momento, no queda claro cual es la función de cIIgNnRH, pero varios estudios indicarian que junto con la regulación de la síntesis y secreción de gonadotrofinas hipofisarias, tendría un rol como neurotransmisor o neuromodulador (King & Millar, 1992).

Según algunos autores (Muske, 1993), la expresión de las distintas variantes de GnRH en vertebrados gnatostomados, se debería a la presencia de dos grandes sistemas GnRHérgicos, que tendrían un origen embriológico diferente, y se proyectaría a distintos blancos. A raíz de esto, en el sistema nervioso central, los cuerpos celulares y fibras de GnRH adoptarían una organización neuroanatómica particular.

En vertebrados no mamíferos, las diferentes formas moleculares de GnRH están distribuidas diferencialmente en el cerebro (Yu et al, 1988; King et al, 1990; Okuzawa et al, 1990; Amano et al, 1992; King et al, 1986; Northcutt et al, 1994; Mikami et al, 1988; Katz et al, 1990; Sharp et al, 1990). En estas especies la conservada cIIgNnRH predomina en áreas cerebrales extrahipotalámicas, mientras la segunda forma de GnRH prevalece en el hipotálamo.

Un patrón similar se obtuvo en un estudio sobre la distribución diferencial por regiones de las variantes de GnRH en el cerebro de especies de euterios primitivos (musk shrew) (Dellovade et al, 1993)

Por esta razón analizamos la inmunoreactividad presente en distintas áreas del encéfalo del peludo, intensificando la caracterización de cII GnRH en Mesencéfalo, Hipocampo y cerebelo.

En principio, se empleó PBL#45 y PBL#49 en un sistema que utiliza sGnRH como estandar y como trazador, ya que se han utilizado como primer sistema de detección de variantes moleculares de GnRH (Yu et al, 1988 ; Somoza et al, 1994 ; 1996). Ambos antisueros tienen baja reactividad frente a cII GnRH (25.9%, 32.6%). Ante esta circunstancia, se utilizó cII678 cuya reactividad frente a cII GnRH es del 81%. Con el mismo se realizó RIAs solamente con el set completo de las fracciones cromatografiadas de los extractos de Hipocampo y Mesencéfalo, dada las limitaciones en la cantidad de material y disponibilidad de antisuero.

Por este motivo, se tomaron las fracciones cromatografiadas de todos los extractos que contienen la fracción en la cual eluye cII GnRH (fracciones 23-31) y se analizó la presencia de la hormona inmunoreactiva. Para ello se utilizó un sistema homólogo y específico para cII GnRH, en el cual se empleó cII675, antisuero que muestra una alta especificidad frente a cII GnRH.

Con este análisis, se esclareció una duda que se nos había planteado inicialmente. En el extracto de mesencéfalo, se observaba un pequeño pico inmunoreactivo (contenido en las fracciones 23-31) con los tres sistemas de RIA: PBL#45, PBL#49 y cII678. Sin embargo la inmunoreactividad presente era similar a la observada para la pegada inespecífica. Entonces se planteaba la siguiente pregunta: Se trataba de pegada inespecífica o de concentraciones tan bajas de cII GnRH que era indetectable con estos antisueros?

Los resultados obtenidos confirmaron los estudios iniciales no hallándose evidencias de la presencia de cII GnRH en los distintos lotes y confirmando la presencia de ir-mGnRH en área preóptico-hipotalámica, bulbos olfatorios, neocortex, mesencéfalo, hipocampo y cerebelo, probablemente debido a la existencia de un único sistema GnRHérgico, de localización anterior.

Sin embargo, es importante recalcar, que en el hipocampo dorsal de esta especie, se han descrito gran cantidad de fibras ir-GnRH y de células dispersas (Rodríguez D., 1996).

En algunas cromatografías (especialmente en la de extracto de áreas preóptico-hipotalámicas) la inmunoreactividad de GnRHs natural eluye más temprano que los péptidos sintéticos, debido probablemente a la saturación de la columna con extracto de tejido, lo cual es un fenómeno conocido para el sistema (King et al, 1994).

En la cromatografía de algunos de los extractos se observa inmunoreactividad (no muy elevada) a GnRH entre las fracciones 10-14 (Figura 6,7 y 8), pero esto no es totalmente constante. Hasta el momento no se identificó ninguna variante de GnRH cuyo tiempo de retención coincidiera con los minutos 10-14, con lo cual no se obtuvo una explicación definitiva acerca de lo que ocurre en estas fracciones. Probablemente podría tratarse de un producto de proteólisis que se manifiesta con frecuencia en la cromatografía, pero quedaría por probarlo.

El orden insectívoro está visto como la rama a partir de la cual evolucionan murciélagos, ardillas voladoras y primates (Simpson et al, 1945). Posiblemente por su primitivo estatus la rata almizclera, así como los vertebrados no mamíferos y los primitivos marsupiales, presentan múltiples formas de GnRH en el cerebro.

Interesantemente entre los mamíferos metaterios tanto cllGnRH como mGnRH se expresan en varias especies (King et al, 1989; 1990; 1994), mientras que se ha detectado en una especie considerada más avanzada únicamente mGnRH (King et al, 1989). Esto sugiere que el avance evolutivo hacia la radiación de mamíferos podría llevar a la pérdida de la expresión de cllGnRH, o que por el contrario sería independiente de la radiación.

Para contestar esta incógnita habría que analizar que ocurre en un número mayor de especies, entonces sí podría dilucidarse si los edentados se considerarían “primitivos” o “evolucionados” respecto al sistema GnRHérgico.

V. BIBLIOGRAFIA

Adelman, J.P.; Mason, A.J.; Hayflick, J.S. & Seeburg, P.H. (1986)

Isolation of the gen and hipothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin inhibiting factor in human and rat.

Proceedings of the Natural Academy of Sciences. U.S.A. 83: 179-183.

Amano, M.; Aida, K.; Okumoto, N.; and Hasegawa, Y. (1992)

Changes in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in the brain and pituitary, and GTH contents in the pituitary in female Masu salmon, *Oncorhynchus masou*, from hatching through ovulation.

Zoological Sciences 9: 375-386.

Andersen, Ø and Klungland, H.(1993).

The salmon GnRH encoding gen in Teleost fish.

International review of citology, vol.147

Bogerd, J.; Zandbergen, T.; Andersson, E.; and Goos, H. (1994).

Isolation, characterization and expression of cDNAs encoding the catfish-type and chicken-II-type gonadotropin-releasing hormone precursors in the African catfish.

Eur. J. Biochemistry 222(2): 541-549.

Bond, C.T., Francis, R.C., Fernald, R.D., and Adelman, J.P.(1991).

Characterization of complementary DNA encoding the precursor for gonadotropin-releasing hormone and its associated peptide from a teleost fish.

Molecular Endocrinology 5: 931-937.

Burgus, R.; Butcher, M.; Amoss, M.; Ling, N.; Monahan, M.; Rivier, J.; Fellows, R.; Blackweel, R.; Vale, W. & Guillemin, R. (1972).

Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF).

Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A. 69: 278-282.

Chang, J.P. & Jobin, R.M. (1994)

Regulation of gonadotropin release in vertebrates: a comparison of GnRH mechanisms of actions.

Comparative Endocrinology, 41-51.

Colbert, E.H. (1969).

“Beginning of the mammals”(capítulo 17, pg 250-263.); “Introduction to the placentals”(capítulo 19, pg 274-285); y “The diverging placentals”(capítulo 20, pg 286-299).

En The Evolution of Vertebrates. Second Edition. De. Willey International.

Conlon, J.M.; Collin, F.; Chiang, Y.C.; Sower, S.A.; and Vaudry, H. (1993).

Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone from the brain of the frog, *Rana ridibunda*: purification, characterization and distribution.

Endocrinology 132: 2117-2123.

Dellovade, T.L.; King, J.A.; Millar, R.P.; and Rissman, E.F. (1993).

Presence and differential distribution of distinct forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in the musk shrew brain.

Neuroendocrinology 58: 166-177.

- Dunn, I.C., Chen, Y., Hook, C., Sharp, P.J., and Sang, H.M. (1993).
Characterization of the chicken preprpgpnadotrophin-releasing hormone-I-gene.
Journal of Molecular Endocrinology 11: 19-29
- Engelmann, G.F. (1985).
“The Phylogeny of the Xenarthra”.
En The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas. De. G.G.
Montgomery, Smithsonian Institution, pg 51-64.
- Fink, G. (1988).
Gonadotropin secretion and its control.
En “The Physiology of reproduction”(E. Knobil & J. Neill, Eds) pp 1349-1377,
Raven Press, Ltd N.Y.
- Gautron, J.P.; Pattou, E.; Bauer, K.; Kordon, C. (1991).
(Hydroxyproline) luteinizing hormone-releasing hormone: a novel peptide in
mammalian and frog hypothalamus.
Neurochemistry International 18: 221-235.
- Gothilf, Y.; Elizrr, A.; Chow, M.; Chen, T.; and Zohar, Y. (1995).
Molecular cloning and characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone
from the gilthead seabream (*Sparus aurata*).
Molecular Marine Biology and Biotechnology 4: 27-35.

Gothilf, Y.; Muñoz-Cueto, J.; Sagrillo, C.; Selmanoff, M.; Chen, T.; Kah, O.; Elizur, A.; and Zohar, Y. (1996).

Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxiribonucleic acid characterization and brain localization.

Biology of Reproduction 55: 636-645.

Green, J.D. and Harris, G.W. (1947)

Journal of Endocrinology 5, 136-146.

Heienhorst, J.; Morley, S.D.; Figueroa, J.; Krentler, C.; Lederis, K.; and Richter, D.(1989).

Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A. 86: 5242-5246.

Kelsall, R.; Coe, I.R.; Sherwood, N.M. (1990).

Phlogeny and ontogeny of gonadotropin releasing hormone: comparison of guinea pig, rat, and a protochordate.

General and Comparative Endocrinology 78: 479-494.

King, J.A. & Millar, R.P. (1979).

Heterogeneity of vertebrate luteinizing hormone-releasing hormone.

Science 206: 67-69.

King, J.A. & Millar, R.P. (1980)

Comparative aspects of luteinizing hormone-releasing hormone structure and function in vertebrate phylogeny.

Endocrinology 106: 707-717.

King, J.A. & Millar, R.P. (1982a).

Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. I. Structural determination on partially purified material.

Journal of Biological Chemistry 257: 10722-10728.

King, J.A. & Millar, R.P. (1982b).

Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone. II. Isolation and characterization.

Journal of Biological Chemistry 257: 10729-10732

King, J.A.; and Millar, R.P. (1985)

Multiple molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in teleost fish brain.

Peptides 6: 689-694.

King, J.A.; and Millar, R.P. (1986)

Identification of His⁵, Trp⁷, Tyr⁸-GnRH (chicken GnRH II) in amphibian brain.

Peptides 7: 827-834.

King, J.A.; and Millar, R.P. (1987).

Phylogenetic diversity of LHRH.

En Vickery, B.H.; and Nestor, J.J. (eds.), LHRH and Its Analogs. Contraceptive and Therapeutic Applications, MTP Press Ltd, Lancaster, U.K., pp. 53-73.

King, J.A.; Hassan, M.F.; Mehl, A.E.I.; Millar, R.P. (1988).

Gonadotropin-releasing hormone molecular forms in mammalian hypothalamus.

Endocrinology 122: 2742-2752.

King, J.A.; Mehl, A.E.I.; Tyndale-Biscoe, C.H.; Hinds, L.; and Millar, R.P. (1989).
A second form of GnRH, with chicken GnRH II-like properties, occurs together with
mammalian GnRH in marsupial brains.
Endocrinology 125: 2244-2252.

King, J.A.; Hinds, L.A.; Mehl, A.E.I.; Saunders, N.R.; and Millar, R.P. (1990a).
Chicken GnRH II occurs together with mammalian GnRH in a South American
species of marsupial (*Monodelphis domestica*).
Peptides 11: 521-525.

King, J.A. & Millar, R.P. (1990)
Genealogy of the GnRH Family.
Progress in Comparative Endocrinology, pp 54-59, Wiley-Liss, inc.

King, J.A.; Dufour, S.; Fontaine, Y.A.; and Millar, R.P. (1990b)
Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and cII GnRH
in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary
Peptides 11: 507-514.

King, J.A. & Millar, R.P. (1992)
Evolution of gonadotropin-releasing hormones.
Trends Endocrinol. Metab. 3:339-346.

King, J.A.; Steneveld, A.A.; Curlewis, J.D.; Rissman, E.F.; and Millar, R.P. (1994).
Identification of chicken GnRH II in brains of metatherian and early-evolved
eutherian species of mammals.
Regulatory Peptides 54: 467-477.

King, J.A. & Millar, R.P. (1995)

Evolutionary aspect of gonadotropin-releasing hormone and its receptor.

Molecular and Cellular Neurobiology En prensa.

Loumaye, E., Thorner, J., and Catt, K.J. (1982).

Yeast mating pheromone activates mammalian gonadotrophs: evolutionary conservation of a reproductive hormone?

Sciences 218: 1323-1325.

Lovejoy, D.A.; Sherwood, N.M.; Fischer, W.H.; Jackson, B.C.; Rivier, J.E. and Lee, T. (1991a)

Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from the brain of a holocephalan (*ratfish: Hydrolagus collilei*).

General and Comparative Endocrinology, 82: 152-161.

Lovejoy, D.A.; Fischer, W.H.; Parker, D.B., McRory, J.E., Park, M., Lance, V., Swanson, P.; Rivier, J.E. and Sherwood, N.M (1991b)

Primary structure of two forms of gonadotropin-releasing hormone from brains of the American alligator (*Alligator mississippiensis*).

Regulation of Peptides 33: 105-116.

Lovejoy, D.A.; Fischer, W.H.; Ngamvongchon, S.; Craig, A.G.; Nahorniak, C.S.; Peter, R.E.; Rivier, J.E.; & Sherwood, N.M. (1992).

Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution.

Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A. 89: 6373-6377.

- Lovejoy, D.A., King, J.A., Sherwood, N.M., and Peter, R.E. (1993).
Identification of gonadotropin-releasing hormone and associated binding substances
in the blood serum of holocephalan (*Hydrolagus coliei*).
Peptides 14: 1237-1243.
- Mason, A.J.; Hayflick, J.S.; Zoeller, R.T.; Young, W.S.; Phillips, H.S.; Nikolics, K.
& Seeburg, P.H. (1986).
A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for
hypogonadism in the hpg mouse.
Sciences 234: 1366-1371.
- Matsuo, H.; Baba, Y.; Nair, R.M.G.; Arimura, A.; and Schally, A.V. (1971).
Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. I The proposed amino acid
sequence.
Biochemistry and Biophysics Research Communications 43: 1334-1339.
- Mayo, K.E.; Vale, W.; Rivier, J.; Rosenfeld, M.G.; and Evans, R.M. (1983).
Nature 306: 86-88.
- Mikami, S., Yamada, S., Hasegawa, Y., and Miyamoto, K. (1988).
Localization of avian LHRH-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the
domestic fowl, *Gallus domesticus* and the japanese quail, *Coturnix coturnix*.
Cell. Tissue Res. 251: 51-58.
- Muske, L. (1993).
Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system.
Brain Behav. Evol. 42: 215-230.

Miyamoto, K.; Hasegawa, Y.; Iragashi, M.; Chino, N.; Sakakibara, S.; Kangawa, K.; & Matsuo, H. (1983).

Evidence that chicken hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone is [Gln (8)] LHRH.

Life sciences 32: 1341-1347.

Miyamoto, K.; Hasegawa, Y.; Nomura, M.; Iragashi, M.; Kangawa, K.; & Matsuo, H. (1984).

Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropins secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species.

Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A. 81: 3874-3878.

Ngamvongchon, S.; Lovejoy, D.A.; Fischer, W.H.; Craig, A.G.; Nahorniak, C.S.; Peter, R.E.; Rivier, J.E.; & Sherwood, N.M. (1992).

Characterization of the primary structure of gonadotropin releasing hormone in the Thai catfish (*Clarias macrocephalus*).

Cellular and Molecular Neurosciences 3: 17-22.

Northcutt, R.G.; and Muske, L.E. (1994)

Multiple embryonic origins of gonadotropins releasing hormone (GnRH) immunoreactive hormones

Dev. Brain Res 78: 279-290

Pati, D. and Habibi, H.R. (1993)

Characterization of gonadotropin-releasing hormone receptors in goldfish ovary: variation during follicular development

Am. J Physiol. 264

(Regulatory Integrative Comp. Physiol. 33): R227-R234.

Powell, R.C.; King, J.A.; and Millar, R.P. (1985).

[Trp⁷, Leu⁸]LH-RH in reptilian brain.

Peptides 6: 223-228.

Powell, R.C.; Millar, R.P. .; and King, J.A (1986a).

Diverse molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in an elasmobranch and a teleost fish.

General Comparative Endocrinology 63: 77-85.

Powell, R.C.; Ciarcia, G.; Lance, V.; Millar, R.P. and King, J.A. (1986b).

Identification of diverse molecular forms of GnRH in reptile brain.

Peptides 7: 1101-1108.

Powell, J.F.F.; Zohar, Y.; Elizur, A.; Park, C.; Fischer, W.H.; Craig, A.G.; Rivier, J.E.; Lovejoy, D.A.; and Sherwood, N.M. (1994).

Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brain of one species.

Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A. 91: 12081-12085.

Powell, J.F.F.; Reska-Skinner, S.M.; Prakash, O.M.; Fischer, W.H.; Park, M.; Rivier, J.E.; Craig, A.G.; Mackie, G.O.; & Sherwood, N.M. (1996).

Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications.

Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A. 93: 10461-10464.

Rodriguez Gil, D. (1996)

Estudio de la distribución neuroanatómica de mGnRH (Hormona Liberadora de Gonadotrofinas de mamífero), en el cerebro del armadillo *Chaetophractus villosus* (Dasypodidae).

Tesis de licenciatura

Seeburg, P.H. & Adelman, J.P. (1984)

Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone.

Nature 311: 666-668.

Seeburg, P.H.; Mason, A.J.; Young III, W.S.; Stewart, T.A.; and Nikolics, K. (1989).

Journal of steroid Biochemistry 33: 687-691.

Sherwood, N.M.; Eiden, L.; Brownstein, M.; Spiess, J.; Rivier, J.; and Vale, W. (1983).

Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone.

Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A. 80: 2794-2798.

Sherwood, N.M.; Harvey, B.; Brownstein, M. and Eiden, L.(1984)
Gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in striped mullet (*Mugil cephalus*),
milkfish (*Chanos chanos*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*): comparison with
salmon GnRH.
General Comparative Endocrinology 55: 174-181.

Sherwood, N.; Sower, S.A.; Marshak, D.R.; Fraser, B.A. & Brownstein, M.J.
(1986).
Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain.
Journal of Biological Chemistry 261: 4812-4819.

Sherwood, N.& Lovejoy, D.(1989).
The origin of the mammalian form of GnRH in primitive fishes.
Fish Physiology and Biochemistry 7: 85-93.

Sherwood, N; Deleeuw, R.; and Goos, H. (1989).
A new member of the gonadotropin-releasing hormone family in teleosts: catfish
gonadotropin-releasing hormone.
General and Comparative Endocrinology 75: 427-436.

Sherwood, N. (1987).
The GnRH family of peptides.
Trends. Neurosci. 10: 129-132.

Sherwood, N.M.; Dorosov, S.; and Lance, V. (1991)
Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in bony fish that phylogenetically
ancient: reedfish (*Calamoichthys calabaricus*), sturgeon (*Acipenser transmontanus*)
and Alligator gar (*Lepisosteus spatula*)

General Comparative Endocrinology 84: 44-57.

Sherwood, N.M.; Lovejoy, D.A. and Coe, I.R. (1993)

Origin of Gonadotropin-Releasing Hormones

Endocrinology Rev. 14: 241-254

Silver, R.; Ramos, C.L.; Silverman, A.J. (1992)

Sexual behavior triggers appearance of non-neuronal cells containing gonadotropin-releasing hormone-like immunoreactivity.

Journal of Neuroendocrinology(en prensa).

Somoza, G.M. ; Stefano, A. ; D'Eramo, J.L. ; Canosa,L.F. & Fridman,O. (1994).

Immunoreactive GnRH suggesting a third form of GnRH in addition to cllGnRH and sGnRH in the brain and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes).

General and Comparative Endocrinology 61: 313-322.

Somoza, G.; Paz, D.; Stefano, A. and Affanni, J.M. (1996).

Identification of immunoreactive mammalian gonadotropin-releasing hormone in the brain of metamorphic larvae of *Bufo arenarum* Hensel (Amphibia anura).

International Journal of developmental Neuroscience 14: 663-672.

Sower, S.A.; Chiang, Y.C.; Lovas, S. & Conlon, M. (1993).

Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain.

Endocrinology 132: 1125-1131.

Stefano, A.V. ; Fridman, o. & Somoza, G.M. (1995)

Chromatographic and immunological evidence for a third form of GnRH in addition to cllGnRH and sGnRH in the brain of *Odontheistes bonariensis* (Atheriniformes).

Enviado a 5th International Symposium on Reproductive Physiology of fish. The University of Texas at Austin, Austin, Texas, U.S.A.

(2-8 de Julio).

White, S.A., Bond, C.T., Francis, R.C., Kasten, T.L., Fernald, R.D., and Adelman, J.P. (1994).

A second gene for gonadotropin-releasing hormone: cDNA and expression pattern in the brain.

Proceedings of the Natural Academy of Sciences U.S.A. 91: 1423-1427.

Yu et al, K.L. ; Sherwod, N.M. ; and Peter, R.E. (1988)

Differential Distribution of two molecular frms of ginadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*)

Peptides 9 : 625-630.

J. H. H. H.

J. H. H. H.