

FILOGENIA DE LA POBLACIÓN DE NEURONAS PRODUCTORAS DE HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH) DE LOS VERTEBRADOS

A.T. Soto¹, G. Zuccolilli²

¹Cátedra de Reproducción Animal. Instituto de Teriogenología. ²Cátedra de Anatomía Comparada. Instituto de Anatomía. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) tiene la función de regular la síntesis y liberación de las hormonas gonadotróficas hipofisiarias, que gobiernan las funciones gonadales de los vertebrados. Si bien la hormona es un decapeptido, hasta el momento, se han aislado y secuenciado nueve formas estructurales diferentes de GnRH en vertebrados. La mayoría de las especies expresan dos o más variantes moleculares de GnRH, siendo "chicken II GnRH" (cII GnRH), una variante presente casi universalmente. El origen y la ruta migratoria de las neuronas GnRH, ha sido descrita en distintos animales y a pesar de la distancia filogenética, aparece muy similar desde los peces hasta los mamíferos. La localización encefálica de esta población neuronal muestra similitudes y diferencias entre los distintos vertebrados y también en los distintos órdenes de mamíferos estudiados. Estas variaciones anatómicas coinciden con mecanismos fisiológicos diferentes y pueden aplicarse para aclarar los cambios evolutivos que influyen en el desarrollo de nuevas estrategias reproductivas.

Palabras Clave: neuronas, GnRH, embrión, migración, encéfalo, vertebrados.

PHYLOGENETIC STUDY OF THE POPULATION OF GONADOTROPHIN-RELEASING HORMONE (GNRH) NEURONS OF THE VERTEBRATES

Abstract: Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) is an hypothalamic decapeptide that regulates the reproductive system of vertebrate by stimulation of synthesis and release of pituitary gonadotrophin hormones. Nine molecular variants of this hormone have been isolated and identified from brain extracts of different vertebrate species. Most of them expressed two or more forms of GnRH, and the molecular variant named "chicken II GnRH" (cII GnRH) have been isolated in almost of the species studied. The origin and migration of GnRH neurons have been described strikingly similar in different animals classes, from fishes to mammals. The distribution pattern of GnRH cell bodies has been examined in several species. Although in general the emplacement of GnRH neurons appear similar, most cell bodies being located in the hypothalamus, a considerable interspecies-variation has been reported for the proportion of GnRH neurons in various hypothalamic regions. These anatomical variations were observed in coincidence with modification of the physiological patterns and could be applied to explain the development of dissimilar reproductive behavior by animal species.

Key words: GnRH, embryo, migration, brain, vertebrates.

Fecha de recepción: 08/06/00

Fecha de aprobación: 16/07/01

Dirección para correspondencia: A.Soto, CC 296 (B1900AVW) Cátedra de Reproducción Animal. Instituto de Teriogenología La Plata, ARGENTINA.

E-mail: asoto@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido que gobierna la función reproductiva en la mayoría de los vertebrados. Esta hormona, sintetizada por neuronas secretoras ubicadas en el hipotálamo, es liberada en los vasos de la eminencia media para regular la producción y liberación de las hormonas gonadotróficas hipofisarias, folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), responsables de desencadenar los procesos de esteroidogénesis y gametogénesis gonadal. La neurofisiología reproductiva de diversas clases animales muestra una organización similar en lampreas (1), peces (2), anfibios (3), reptiles (4), aves (5, 6) y mamíferos (7), existiendo homologías anatómicas y funcionales, aun cuando cada clase, orden y especie posee estrategias reproductivas derivadas de las variaciones adaptativas al medio donde desarrollan su vida.

Variantes estructurales de GnRH:

La primer forma estructural de GnRH ha sido aislada a partir del hipotálamo de porcinos y ovinos (8, 9), sin embargo, en las últimas tres décadas, la estructura molecular de GnRH ha sido secuenciada en representantes de las siete clases de vertebrados (10). Hasta el presente, han sido demostradas nueve variantes moleculares de GnRH en vertebrados y dos en invertebrados (10, 11, 12, 13). La estructura de la GnRH se encuentra conformada por una cadena de diez aminoácidos y muestra cinco de ellos constantes en las diferentes formas conocidas. El grupo amino terminal (aminoácido 1 y 2), el carboxilo terminal (aminoácido 9 y 10) y el cuarto aminoácido han sido descritos idénticos para las diferentes formas aisladas (10, 11, 12).

En el hipotálamo del pollo han sido encontradas dos variantes de GnRH: chicken I (cGnRH-I) (5, 14, 15) y chicken II (cGnRH-II) (6). En peces teleosteos, a partir de extractos de tejidos cerebrales han sido secuenciadas tres formas moleculares de la hormona, una en el salmón del Pacífico, *Oncorhynchus keta*, (sGnRH) (16), otra en el bagre tailandés, *Clarias macrocephalus* (cfGnRH) (17) y una tercera en *Spaurus aurata* (sbGnRH) (18).

En mamíferos, la estructura de una sola variante de GnRH (mGnRH) ha sido aislada y secuenciada a partir de extractos encefálicos de porcinos, *Sus scrofa* (9), ovinos, *Ovis aries* (8), ratas, *Rattus norvegicus* (19), ratones, *Mus musculus* (20) y humanos, *Homo sapiens* (19, 21).

Las restantes variantes encontradas en ver-

tebrados han sido informadas en extractos cerebrales del tiburón *Squalus acanthias* (sbGnRH) (22) y de la lamprea, *Petromyzon marinus* (hGnRH) (23, 24). Sin embargo, existen evidencias de la presencia de otras variantes de GnRH, en otras especies de vertebrados investigados (25, 26, 27, 28).

Distribución taxonómica de variantes de GnRH en vertebrados:

En la mayoría de los peces se ha demostrado la presencia de dos variantes de GnRH, y sólo en algunas especies de peces ha sido detectada la expresión de tres variantes. La forma molecular cIIIGnRH ha sido reportada como una constante en todas las especies de peces estudiadas (16, 17, 18, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34).

La mayor parte de los anfibios estudiados expresan tres formas de GnRH: cIIIGnRH, mGnRH y una tercer variante con características similares a sGnRH (10, 23, 35, 36). Sin embargo, en reptiles y aves han sido solamente identificadas cIGnRH y cIIIGnRH (5, 6, 14, 15, 31, 37, 38).

En mamíferos marsupiales e insectívoros (25, 26, 39, 40) también se han identificado dos variantes moleculares de GnRH: mGnRH y cIIIGnRH. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre los demás grupos de mamíferos euterios. A pesar de las evidencias surgidas en estudios preliminares, que indicaban la presencia de dos o más péptidos con actividad liberadora de gonadotropinas en el hipotálamo de ratas y cerdos, estudios realizados combinando cromatografía líquida de alta presión, técnicas inmunológicas y actividad biológica sólo detectaron la presencia de una única variante (mGnRH) en ratas, ovinos y humanos (12, 25). El grupo de roedores histricomorfos mostró características especiales ya que se constató, usando métodos cromatográficos e inmunológicos, la presencia de tres variantes de GnRH. Las formas descritas en el carpincho (*Hydrochaeris hydrochaeris*) correspondieron a sGnRH, cIIIGnRH y mGnRH. (41)

Origen y migración de las neuronas GnRH:

En peces, reptiles, aves, y mamíferos (42, 43, 44, 45, 46, 47, 48), se encuentra documentado que las células precursoras de las neuronas GnRH son detectadas originalmente en la región nasal antes de aparecer en el cerebro. La población de células GnRH, toma origen en la placoda olfatoria y migra durante el desarrollo a lo largo del nervio terminal o nervio olfatorio, hasta alcanzar su localización definitiva en el hipotálamo. Las investi-

gaciones son coincidentes en el sentido que las neuronas GnRH se originan en la placa olfatoria y en el epitelio embrionario de las coanas posteriores, y realizan una migración asociada al nervio terminal (43, 44, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54).

En estudios inmunohistoquímicos realizados en peces (*Oncorhynchus keta*, *Colisa lalia*, *Oreochromis niloticus*), las neuronas GnRH se detectaron en la parte basal de la placoda olfatoria en forma aislada o formando pequeños acúmulos celulares. Después de la eclosión, las células se observaron secuencialmente en el nervio olfatorio y parte rostral del cerebro. En estado juvenil las neuronas GnRH migran siguiendo el nervio terminal, incrementan su número y tamaño, y sus axones se extienden hasta el telencéfalo ventromedial y el hipotálamo (49, 55, 56).

En reptiles (*Anolis carolinensis*), no se observaron neuronas o fibras GnRH en el cerebro anterior. En el cerebro medio, sin embargo, se detectaron cuerpos neuronales a lo largo del borde medial del fascículo longitudinal las que proyectan sus axones hacia los núcleos de los nervios craneales III y IV. En el cerebro posterior, fibras GnRH se detectaron en el área del núcleo vestibular y funículo dorsal (57).

En aves (*Gallus gallus domesticus* y *Melaegris gallopavo*) las neuronas GnRH se evidenciaron sobre el epitelio olfatorio al tercer día del desarrollo embrionario, y comienzan su migración entre los días 3 y 4 (54, 58). La aparición en el telencéfalo se produce a partir de los días 4 y 5, siguiendo una ruta migratoria similar a los otros vertebrados (54, 58). A partir del quinto día del desarrollo del pollo, se detectaron neuronas GnRH en el diencéfalo formando una población de origen extraolfatorio (58). Durante el sexto y séptimo día, cordones de neuronas GnRH se extienden sobre el nervio olfatorio a lo largo del septo nasal para atravesar la porción ventromedial del cerebro anterior. A la edad de 8 días, se pone en evidencia una marcada disminución en el número de células GnRH en el epitelio olfatorio y concomitantemente se incrementa en el área del cerebro anterior. Finalmente, en el día 11 del desarrollo la mayoría de las neuronas GnRH se encontraron en su localización adulta (54, 58).

En dos órdenes de mamíferos, roedores, *Mus musculus* (46, 48, 64), *Rattus norvegicus* (43, 59, 60, 61), *Cavia porcellus* (62, 63), y primates (*Macaca mulatta*) (44, 47, 51), se encuentran estudios que describen el origen y la ruta migratoria del sistema neuronal GnRH.

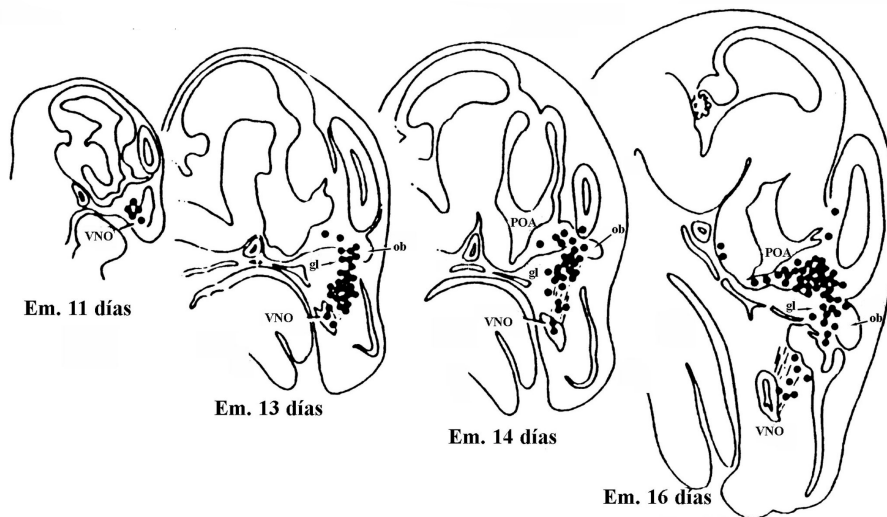


Figura 1: El esquema muestra la ruta migratoria de las neuronas GnRH desde la placa olfatoria en un embrión de ratón de 11 días hasta su localización definitiva en el hipotálamo rostral en un embrión de 16 días. En los estadios intermedios (13 y 14 días) se detalla el recorrido de los cuerpos neuronales (círculos negros) siguiendo los nervios. gl: ganglio terminal; ob: bulbo olfatorio; POA: área preóptica; VNO: órgano vomeronasal. (Adaptado de Shwanzel-Fukuda, M. 1997).

Figure 1. The migratory route GnRH immunoreactive neurons from the medial olfactory placode to the forebrain is shown in drawings in the saggital plane of the whole heads of embryonic mice on days 11,13, 14 and 16. The neuronal bodies are shown with black dots. Abbreviations: gl: ganglion terminale; ob: olfactory bulb; POA: preoptic area; VNO: vomeronasal organ. (From Shwanzel-Fukuda, M. 1997).

En ratones (*Mus musculus*), las neuronas GnRH se encontraron en el día 10-11 de la gestación en la placa olfatoria medial dentro del primordio del órgano vomeronasal (46, 48, 64). En la rata (*Rattus norvegicus*), durante los días 13,5-14,5 se encontraron células migrando desde del órgano vomeronasal y ascendiendo por el nervio terminal, para alcanzar la superficie media de la vesícula prosencefálica (43, 61). Durante el proceso migratorio las células GnRH se observaron en el septum y llegan a su posición definitiva en el área preóptica, en los días 16,5-17,5 (43, 59, 60).

En el cobayo (*Cavia porcellus*), las neuronas GnRH originalmente se visualizaron en la mucosa nasal, entremezcladas con fibras del nervio olfatorio (62, 63) para ser detectadas posteriormente en el recorrido del nervio terminal el día 28 de gestación (63).

En primates (*Macaca mulatta*), se describieron dos poblaciones celulares reactivas a GnRH, ambas tomando origen en la placoda olfatoria, pero constatándose su presencia en diferente momento de la gestación. Estas poblaciones, son diferentes morfológicamente y su distribución encefálica difiere, siendo las neuronas de aparición tardía las que enriquecen la región mediobasal del hipotálamo, mientras que el grupo temprano coloniza el septum, área preóptica, estría terminal, amígdala y claustrum (51).

En embriones humanos de 42 días, las células GnRH se observaron en el epitelio del primordio olfatorio medial, asociadas a los nervios terminal y vomeronasal (47). En fetos de 12-19 semanas, neuronas GnRH se visualizaron formando fascículos nerviosos surgiendo del órgano vomeronasal.

En la migración de las neuronas GnRH durante la etapa embrionaria y fetal se encuentran involucrados factores físicos y químicos que intervienen en la adhesión celular (45). Cuando se produce una interrupción de la migración normal de las neuronas GnRH, por falta o ausencia de los factores de adhesión celular, aparecen graves consecuencias, estudiadas y detalladas en el humano como Síndrome de Kallmann. Este síndrome, también conocido como Displasia olfatorigenital de Morsier, es un desorden genético caracterizado por un defectuoso desarrollo del sistema olfatorio, ausencia de uno o ambos bulbos olfatorios, anosmia, hipogonadismo y ausencia de libido. (44, 45, 53). Los individuos con este síndrome, muestran una ausencia completa de inmunorreactividad a GnRH en el cerebro. Sin embargo, se visualizan fibras reactivas a GnRH en el nervio terminal de la región nasal y en la superficie dorsal de la placa cribiforme. Estos hechos sugieren que el sistema olfatorio, el órgano vomeronasal y los nervios terminales, así como las neuronas GnRH, tienen un desarrollo normal hasta un determinado momento de la gestación (45).

Distribución de la población neuronal GnRH en el encéfalo mamífero:

La morfología y ubicación de las neuronas GnRH en el encéfalo han sido extensamente investigadas, utilizando técnicas inmunohistoquímicas, en diferentes órdenes de mamíferos: roedores tales como cobayo (*Cavia porcellus*) (65), rata (*Rattus norvegicus*) (66) y coipo (*Myocastor coypus*) (67); rumiantes como oveja (*Ovis aries*) (68) y cabra (*Capra hircus*) (69, 70); carnívoros como el hurón (*Galictis cuja*) (71) y primates como babuinos (*Papio ursinus*) (72) y el hombre (*Homo sapiens*) (71). La localización y distribución es similar en

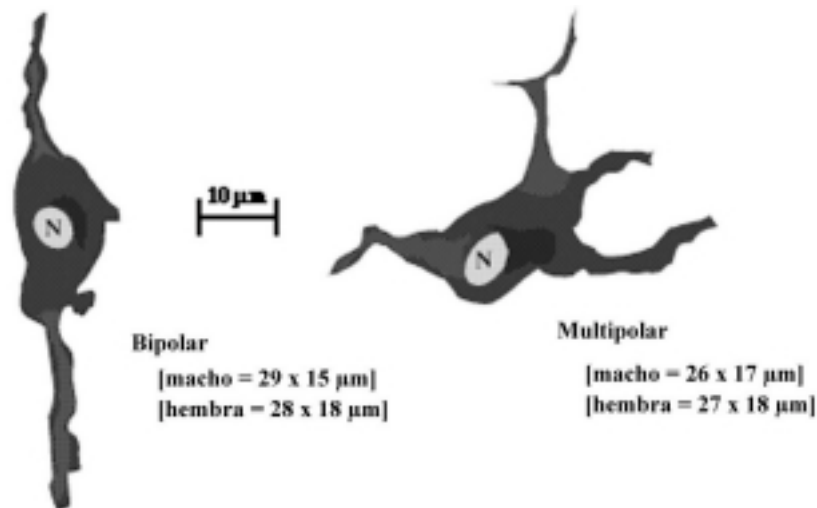


Figura 2. Subtipos morfológicos de neuronas GnRH caracterizados por inmunohistoquímica.
Figure 2. Morphological subtypes of GnRH neurons made evident by immunohistochemistry.

todas las especies citadas, encontrándose la población GnRH en el hipotálamo, aunque existe una considerable variación interespecie en la proporción de neuronas alojadas en las diferentes áreas y núcleos del hipotálamo (73, 74).

En los roedores se localiza el mayor porcentaje de neuronas GnRH en la parte rostral del hipotálamo ocupando principalmente el área preóptica, núcleo medial preóptico, núcleo supraóptico y núcleo supraquiasmático, sin embargo, no se ha comunicado la presencia de cuerpos neuronales en el hipotálamo medio basal.

En los rumiantes los primeros resultados han sido obtenidos utilizando hembras ovinas (75), pero investigaciones posteriores, comparan ambos sexos en caprinos (69, 76) y han demostrado mayor número de neuronas en el macho. La localización del sistema GnRH parece ser similar en los ovinos (*Ovis aries*), sin variaciones entre los

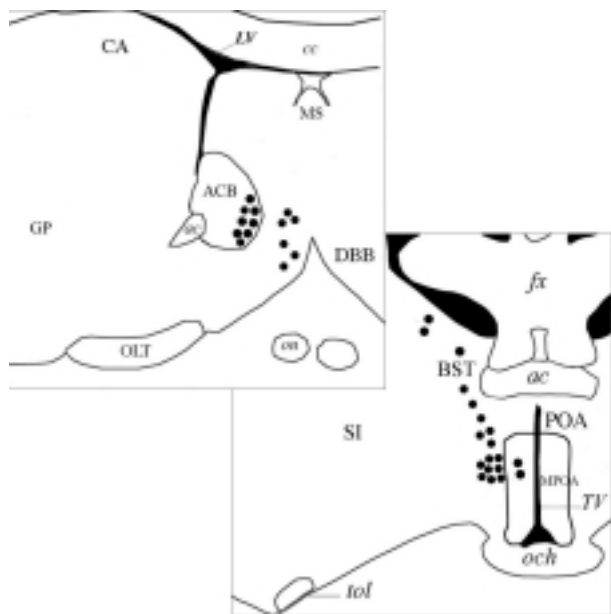


Figura 3: El esquema muestra dos secciones coronales del hipotálamo rostral de un coipo macho adulto. Las neuronas GnRH (círculos negros) se ubican principalmente en el área preóptica (POA) y núcleo de la estría terminal (BST). ac: comisura rostral; fx: fórnix; och: quiasma óptico; tol: tracto olfatorio lateral; GP: globus pallidus; MPOA: núcleo medial preóptico; SI: sustancia innominada; TV: tercer ventrículo.

Figure 3. Schematic coronal sections of the rostral hypothalamus of the adult male coipo showing the GnRH neurons (black dots). The clusters of immunoreactive neurons are mainly located in area preoptic (POA) and bed nucleus of stria terminalis (BST). ac: rostral commissure; fx: fornix; och: optic chiasm; tol: lateral olfactory tract; GP: globus pallidus; MPOA: medial preoptic nucleus; SI: substantia innominata; TV: third ventricle.

sexos (68, 75, 77). El mayor porcentaje de cuerpos neuronales se ubican en el hipotálamo rostral ocupando los núcleos de la estría terminal, supraóptico, medial preóptico y área preóptica. Sin embargo, el 6 % de las neuronas se encontraron en el hipotálamo mediobasal, localizadas en el núcleo arcuato y área hipotalámica anterior. De acuerdo con nuestros estudios en bovinos (*Bos taurus*) (78) no parecen existir diferencias entre los rumiantes poliéstricos estacionales y anuales.

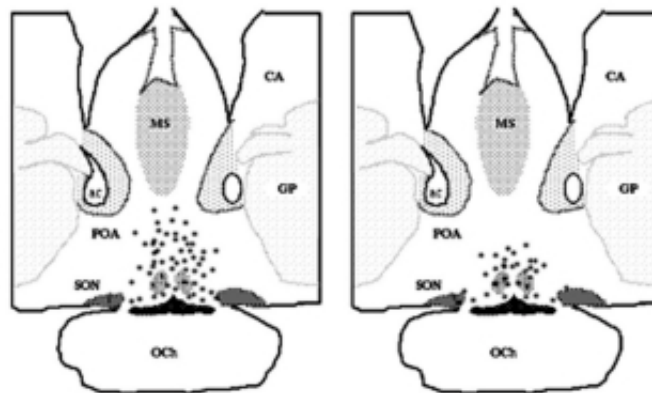


Figura 4. El esquema muestra una sección coronal del hipotálamo rostral en un caprino macho y hembra. Las neuronas GnRH (asteriscos) se ubican en el área preóptica (POA) y núcleo de la estría terminal (BST). ac: comisura rostral; fx: fórnix; och: quiasma óptico; tol: tracto olfatorio lateral; CA: núcleo caudado; GP: globus pallidus; MPOA: núcleo medial preóptico; MS: área septal medial; SI: sustancia innominada; SON: núcleo supraóptico; TV: tercer ventrículo.

Figure 4. Schematic coronal sections of the rostral hypothalamus of the male and female goats showing the GnRH neurons (asterisks). The clusters of immunoreactive neurons are mainly located in area preoptic (POA) and bed nucleus of stria terminalis (BST). ac: rostral commissure; fx: fornix; och: optic chiasm; tol: lateral olfactory tract; CA: caudate nucleus; GP: globus pallidus; MPOA: medial preoptic nucleus; SI: substantia innominata; SON: supraoptic nucleus; TV: third ventricle.

Los datos disponibles para especies de otros órdenes, como hurones (*Galictis cuja*) (71), monos (*Papio ursinus*) (72) y hombre (*Homo sapiens*) (71), han establecido una localización distinta para las mismas neuronas, que se encuentran en el hipotálamo mediobasal especialmente en el núcleo arcuato.

La extensión rostral del sistema GnRH, encontrada en casi todas las especies, representada por axones y escasos cuerpos celulares esparcidos desde el área septal hasta el hipotálamo rostral, podría representar sólo un remanente embriológico de la migración de estos elementos desde la porción olfatoria del embrión (79). Sin

embargo, la proyección caudal del sistema GnRH, representado por las neuronas del núcleo arcuato y los axones que alcanzan el complejo mamilar, podría tener implicancias en la regulación de conductas relacionadas con la reproducción, de acuerdo a las hipótesis postuladas para roedores (60)

se encuentra involucrada en este sector del encéfalo, pues hemos indicado que cIIGnRH es una variante constante y por otro lado, sigue vigente la hipótesis que en los vertebrados, algunas estructuras inmunorreactivas a GnRH podrían tener un origen extraolfactorio.

CONCLUSIONES

El origen de las neuronas GnRH y los signos que presenta la interrupción de su migración en los vertebrados, evidencian la interrelación existente entre el sistema olfatorio y reproductivo. Si bien las experiencias son coincidentes en el origen olfatorio del sistema de neuronas GnRH, queremos enfatizar la íntima conexión que tiene este sistema con la vía olfatoria secundaria, derivada del órgano vomeronasal, donde la GnRH podría actuar como neuromodulador de otras conductas asociadas a la reproductiva. Sin embargo, es necesario establecer qué variante molecular de GnRH

Es conocido que el sistema nervioso central, en su evolución filogenética, incorpora nuevas estructuras sobre las ya existentes, y las áreas nuevas poseen jerárquicamente una función rectora sobre las más primitivas. Sin embargo, en esta revisión no se han encontrado evidencias de que el sistema GnRH se comporte de esta forma. A pesar de demostrarse varias formas moleculares de GnRH, las distintas especies expresan una variante determinada característica de la clase animal a la que pertenecen. Sólo especies postuladas como evolutivamente antiguas son una excepción a este patrón, tal es el caso del carpincho. Por lo

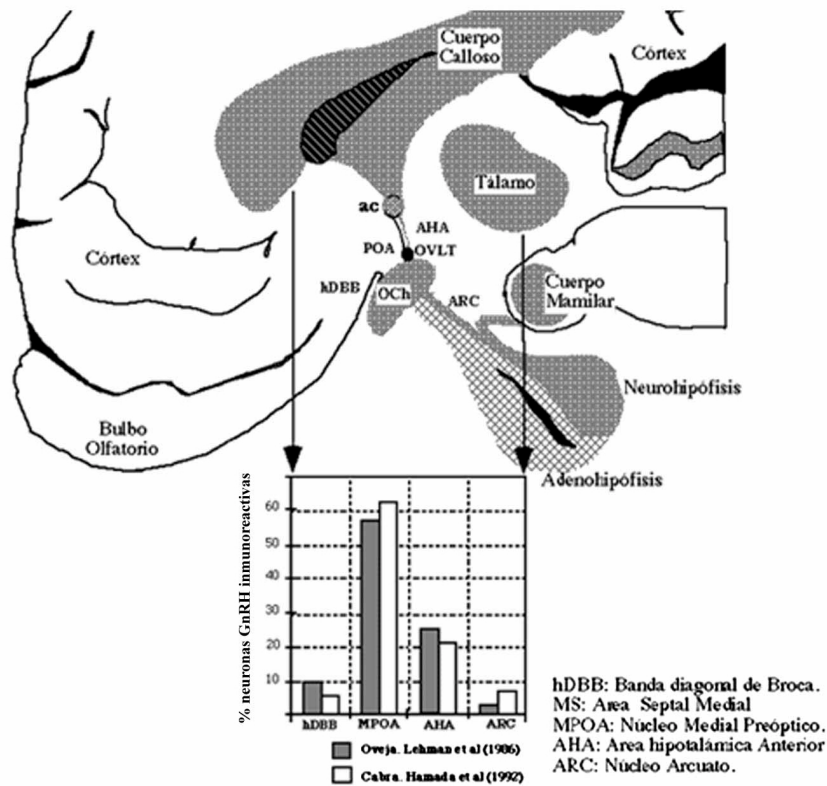


Figura 5. Esquema comparativo de la distribución de las neuronas GnRH, caracterizadas por inmunohistoquímica, en una sección sagital del hipotálamo de hembras rumiantes. En ovinos y caprinos el mayor porcentaje de neuronas GnRH ha sido descrito en el hipotálamo rostral. El MPOA y AHA representan las áreas de mayor concentración, mientras que el ARC en el hipotálamo medio basal, contiene sólo el 6% de las neuronas.

Figure 5. Comparative graphic about GnRH neurons distribution in female domestic ruminants, along the hypothalamus, using immunohistochemistry to identify the population cell. In sheep and goat the majority of GnRH immunoreactive neurons were observed in the rostral hypothalamus. The MPOA and AHA were identified as the main areas containing GnRH cell bodies, and in the mediobasal hypothalamus only a low percentage of scattered neurons was described

tanto, estos estudios se transforman en una línea de investigación que podría cambiar la concepción del proceso evolutivo de algunos circuitos encefálicos.

La mayoría de las clases de vertebrados expresan dos o más formas moleculares de GnRH, siendo cIIIGnRH una variante de presencia constante, aunque de variable concentración en las diferentes clases de vertebrados. Este hecho abre el interrogante sobre si esta última variante cumple una función específica y diferente a la GnRH correspondiente a cada clase. Los trabajos de Montaner, A.D. (1998) nos detallan que no se detecta cIIIGnRH en el hipotálamo del carpincho, único sitio donde se informan cuerpos neuronales en los roedores. Sin embargo, esta variante molecular es abundante en la región olfatoria donde no se han informado neuronas GnRH-ir. Queda sólo la posibilidad de que esta variante esté contenida en fibras de la región olfatoria y proceda de los mismos cuerpos neuronales hipotalámicos, presentando como posible la hipótesis de que cIIIGnRH, es un precursor de las otras formas moleculares o bien coexiste en las mismas neuronas.

En los mamíferos, el grado de desarrollo de los distintos sistemas sensoriales, trae aparejado un cambio en la localización hipotalámica de las neuronas GnRH, y en forma conexas a las diferentes variantes moleculares, concentraciones, y combinaciones respectivas, podrían ser los causales de las diversas conductas y estrategias reproductivas existentes en los diferentes órdenes y especies de mamíferos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sower SA. Effects of lamprey gonadotropin-releasing hormone and analogs on steroidogenesis and spermiation in male sea lampreys. *Fish Physiol. Biochem.* 1989; 7:101-107.
2. Peter RE. Direct neuronal regulation of the teleost adenohypophysis. *J. Exp. Zool.* 1990; Suppl. 4:84-89.
3. Conlon JM, Collin F, Chiang YC, Sower SA, Vaudry H. Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone from the brain of the frog, *Rana ridibunda*: purification, characterization, and distribution. *Endocrinology* 1993; 132:2117-2120.
4. Licht P, Porter D, Millar RP. Specificity of amphibian and reptilian pituitaries for various forms of gonadotropin-releasing hormones *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1987; 66:248-255.
5. Miyamoto K, Hasegawa Y, Igarashi M, Chino N, Sakakibara S, Kangawa K, Matsuo H. Evidence that chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone is (Gln8)-LH-RH. *Life Sci.* 1983; 32:1341-1347.
6. 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. (USA)* 1984; 81:3874-3878.
7. King JC, Millar RP. Gonadotropin releasing-hormones. En: *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications.* Academic Press. 1991; Vol 4 Part.B 4-31.
8. Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R. Primary structure of ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1972; 69:278-282.
9. Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally V. Structure of the porcine LH and FSH-releasing. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971; 43:1334-1339.
10. Sherwood NM, Von Schalburg K, Lescheid DW. Origin and evolution of GnRH in vertebrates and invertebrates. En: *GnRH Neurons. Gene to Behavior.* Parhar I.S. and Sakuma, Y. (eds). 1997; pp: 3-26.
11. King JC, Millar RP. Comparative aspects of luteinizing hormone-releasing hormone structure and function in vertebrate phylogeny. *Endocrinology* 1980; 106:707-717.
12. King JC, Hassan MF, Mehl AEI, Millar RP. Gonadotropin-Releasing Hormone molecular forms in mammalian hypothalamus. *Endocrinology* 1988; 122(6):2742-2752.
13. King JC, Sower SA, Anthony EIP. Lamprey gonadotropin releasing hormone neurons in the brain of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Cell. Tissue Res.* 1988; 253:1-8.
14. King JC, Millar RP. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. I. Structural determination partially purified material. *J. Biol. Chem.* 1982; 257:10722-10728.
15. King JC, Millar RP. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. II. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 1982; 257:10729-10732.
16. Sherwood NM, Eiden L, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1983; 80:2794-2798.
17. Ngamvongchon S, Lovejoy DA, Fischer WH, Craig AG, Nahorniak CS, Peter RE, Rivier JE, Sherwood NM. Primary structures of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Moll. Cell. Neurosci.* 1992; 3:17-22.
18. Powell JEF, Zohar Y, Elizur A, Park M, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Lovejoy DA, Sherwood NM. Three

- forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1994; 91:12081-12085.
19. Adelman J P, Mason AJ, Hayflick JS, Seeburg PH. Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. Proc Natl Acad Sci (USA). 1986; 83:179-183.
 20. Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young III WS, Phillips HS, Nikolis K, Seeburg PH. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the *hpg* mouse. Science 1986; 234:1366-1371.
 21. Seeburg P, Adelman JP. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. Nature 1984; 311:666-668.
 22. Lovejoy DA, Fischer WH, Ngamvongchon S, Craig AG, Nahorniak CS, Peter RE, Rivier JE, Sherwood NM. Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. Proc Natl Acad Sci (USA). 1992; 89:6373-6377.
 23. Sherwood NM, Sower SA, Marshak DR, Fraser BA, Brownstein MJ. Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. J. Biol. Chem. 1986; 261:4812-4819.
 24. Sower SA, Chiang YC, Lovas S, Conlon JM. Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. Endocrinology 1993; 132: 1125-1131.
 25. King JC, Millar RP. Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. Cell Mol Neurobiol. 1995; 15:5-23.
 26. King JC, Hinds LA, Mehl AEI, Saunders NR, Millar RP. Chicken GnRH II occurs together with mammalian GnRH in a South American species of marsupial (*Monodelphis domestica*). Peptide 1990; 11:521-525.
 27. Sherwood NM, Parker DB, McRory JE, Lescheid PW. Molecular evolution of growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone. In Fish Physiology. Vol. XIII (ed. By N. M. Sherwood and C. L. Hew). Academic Press, Inc., San Diego, California. 1994; pp.3-66.
 28. Somoza GM, Stefano AV, D'Eramo JL, Canosa LE, Fridman O. Immunoreactive GnRH suggesting a third form of GnRH in addition to cIIGnRH and sGnRH in the brain and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes). Gen Comp Endocrinol. 1994; 94:44-52.
 29. Lovejoy DA, King JA, Sherwood NM, Peter RE. Identification of gonadotropin-releasing hormone and associated binding substances in the blood serum of a holocephalan (*Hydrolagus colliei*). Peptides 1993; 14: 1237-1243.
 30. King JC, Millar RP. Multiple molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in teleost fish brain. Peptides 1985; 6:689-694.
 31. Powell JEF, Ciarcia G, Lance V, Millar RP, King JA. Identification of diverse molecular forms of GnRH in reptile brains. Peptides 1986; 7:1101-1108.
 32. Sherwood NM. The GnRH family of peptides. Trends Neurosci. 1987; 10:129-132.
 33. Sherwood NM, Harvey B, Brownstein MJ, Eiden LE. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) in stripe mullet (*Mugil cephalus*), milkfish (*Chanos chanos*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*): comparison with salmon GnRH. Gen Comp Endocrinol. 1984; 55:174-181.
 34. 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; 9:625-630.
 35. King JC, Millar RP. Identification of His5, Trp7, Tyr8-GnRH (Chicken GnRH II) in amphibian brain. Peptides 1986; 7:827-834.
 36. King JC, Steneveld AA, Curlewis JD, Rissman EF, Millar RP. Identification of chicken GnRH II in brains of metatherian and early-evolved eutherian species of mammals. Regulatory Peptides 1994; 54:467-477.
 37. Powell JEF, King JA, Millar RP. Trp7, Leu8 LHRH in reptilian brain. Peptides 1985; 6:223-228.
 38. Powell JEF, 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; 8:185-190.
 39. 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; 58:166-177.
 40. King JC, Mehl AEI, Tyndale-Biscoe CH, Hinds LA, 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; 125:2244-2252.
 41. Montanerz AD, Somoza G M, King JA, Bianchini JJ, Bolis CG, Affanni JM. Chromatographic and immunological identification of GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) variants. Occurrence of mammalian and salmon-like GnRH in the forebrain of an eutherian mammal: *Hydrochaeris hydrochaeris* (Mammalia, Rodentia). Regulatory Peptides 1998; 73:197-204.
 42. Boehm N, Roos J, Gasser B. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells in the nasal septum of human fetuses. Brain Res Dev. 1994; 82:1-2,175-80.
 43. 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. Dev Biol. 1990; 140(2):374-387.
 44. Parhar I, Pfaff DW, Scwanzel-Fukuda M. Genes and behavior as studied through gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons: comparative and functional aspects. Cell Mol Neurobiol. 1995; 15(1):107-116.

45. Schwanzel-Fukuda M. The origin and migration of LHRH neurons in mammals: a comparison between species including humans. En: GnRH Neurons. Gene to Behavior. Parhar I. S and Sakuma, Y. (eds.). 1997; pp 221-242.
46. 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. 1994; 321:1-18.
47. Schwanzel-Fukuda M, Crossin KL, Pfaff DW, Bouloux PMG, Hardelin JP, Petit C. Migration of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. J Comp Neurol. 1996; 366:547-557.
48. Zheng LM, Pfaff DW, Scwanzel-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):407-418.
49. Chiba A, Oka S, Honma Y. Ontogenetic development of gonadotropin-releasing hormone-like immunoreactive neurons in the brain of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Neuroscience letters. 1994; 178:51-54.
50. Chiba A, Oka S, Honma Y. Ontogenetic changes in neuropeptide Y-like-immunoreactivity in the terminal nerve of the chum salmon and cloudy dogfish, with special reference to colocalization with gonadotropin-releasing hormone-immunoreactivity. Neuroscience letters 1996; 213:49-52.
51. 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; 380 (3):293-309.
52. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. The migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons from the medial olfactory placode into the medial basal forebrain. Experientia. 1990; 46 (9):956-962.
53. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Migration of LHRH-immunoreactive neurons from the olfactory placode rationalizes olfacto-hormonal relationships. J Steroid Biochem Mol Biol. 1991; 39 (4B):565-572.
54. 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. D. Brain Research 1996; 95:234-244.
55. Maejima K, Oka Y, Park MK, Kawashima S. Immunohistochemical double-labeling study of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive cells and oxytocin-immunoreactive cells in the preoptic area of the dwarf gourami, *Colisa lalia*. Neurosci Res. 1994; 20(2):189-193.
56. Yamamoto N, Parhar IS, Sakuma Y, Ito H. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) innervation of the pituitary in a cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: a brain lesion study. Kaibogaku Zasshi 1998; 73(1):55-57.
57. Rosen G, Sherwood N, King JA. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRHir) is associated with vestibular structures in the green anole (*Anolis carolinensis*) Brain Behav Evol. 1997; 50:3, 129-38.
58. Arai Y, Murakami S, Seki T, Miyakawa M, Kamiya M. Origin and migration of GnRH neurons in the chick embryo: an experimental study. En: GnRH Neurons. Gene to Behavior. Parhar I. S, Sakuma, Y.(eds) 1997; pp: 181-195.
59. 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; 238:3, 348-64.
60. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. Nature 1989; 338 (6211):161-164.
61. 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; 15:7769-77.
62. Schwanzel-Fukuda M, Silverman AJ. The nervus terminalis of the guinea pig: a new luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal system. J Comp Neurol. 1980; 191(2):213-225.
63. 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; 7(3):293-315.
64. Schwanzel-Fukuda M, Reinhard GR, Abraham S, Crossin KL, Edelman GM, Pfaff DW. Antibody to neuronal cell adhesion molecule can disrupt the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons into the mouse brain. J Comp Neurol. 1994; 342(2):174-185.
65. Barry J, Dubois MP, Poulain P. LRF producing cell of the mammalian hypothalamus. Z Zellforsch Mikrosk Anat. 1973; 146:351-366.
66. Kawano, M.; Daikoku, S. Immunohistochemical demonstration of LHRH neurons and their pathways in the rat hypothalamus. Neuroendocrinology 1981; 32:179-186.
67. Silva L, Sanchez H, Acosta W, Portiansky E, Zuccolilli G. GnRH neurons population in the diencephalon of the coypu (*Myocastor coypus*). Revista Chilena de Anatomía. 1999; Aceptado para su publicación.
68. Caldani M, Batailler M, Thiery JC, Dubois MP. LHRH immunoreactive structures in the sheep brain. Histochemistry 1988; 89:129-139.
69. Hamada T. Immunohistochemical study on gonadotropin-releasing hormone neurons in the Shiba goat brain. J Reprod Dev. 1992; 38:133-142.

70. Zuccolilli G, Hamada T, Ichikawa M, Mori M. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron in the forebrain of male Shiba goat. *J Reprod and Dev.* 1994; 40:19-25.
71. King JC, Anthony EIP. LHRH Neurons and Their Projections in Humans and other Mammals: Species comparisons. *Peptides* 1984; 5 suppl. 1: 195-207.
72. Marshall PE, Goldsmith PC. Neurosecretory and neuroendocrine GnRH pathways in the hypothalamus and forebrain in baboon. *Brain Res.* 1980; 193:353-372.
73. Muske LE. Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems. *Brain Behav. Evol.* 1993; 42:215-230.
74. Nozaki M, Tsukahara T, Kobayashi H. Neuronal system producing LHRH in vertebrates". In *Endocrine correlates of reproduction*. Ochiai and al. (eds) Japan Scientific Societies Press. Springer, Tokyo. 1984; 3-27.
75. Polkowska, J. Immunohistochemistry of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and gonadotrophic hormones in the sheep after deafferentation of the hypothalamus. *Cell. Tissue Res.* 1981; 220:637-649.
76. Zuccolilli G, Hamada T, Ichikawa M, Mori M. Sexual dimorphism of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron in the goat hypothalamus. *J Reprod Dev.* 1994; 40:27-32.
77. Dees, W.L. Immunohistochemical localization of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in the brain and infundibulum of the sheep. *Cell Tissue Res.* 1981; 215:181-191.
78. Soto A, Zuccolilli G. GnRH neurones population in the diencephalon of the bovine (*Bos taurus*). *Inédito*.
79. Ronnekleiv OK, Resko JA. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone-containing neurons in early fetal development of Rhesus Macaques. *Endocrinology* 1990; 126 (1):498-511.