

INMUNOLOCALIZACIÓN DE NEURONAS GnRH EN ENCÉFALOS DE FETOS DE MADRES ESTRESADAS

Damiana Borghi Micca¹, María Teresa Mugnaini Cattaneo¹, Débora Cots Negri¹, Héctor Fernando Gauna¹, María Cristina Romanini Caffaratti¹.

¹ Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

dborghi@ayv.unrc.edu.ar

RESUMEN

La supervivencia embrionaria depende del mantenimiento del equilibrio interno u homeostasis. El desarrollo del sistema nervioso central está determinado por factores genéticos y ambientales que interactúan dinámicamente. La migración de las neuronas GnRH desde la placoda olfatoria hasta el área preóptica comienza en el día 10,5 de la gestación en ratas y es de suma importancia para el éxito reproductivo en la vida adulta. Prácticas como la inmovilización, activan el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal inhibiendo la secreción de GnRH desde el hipotálamo, la liberación de LH inducida por GnRH en la hipófisis y alterando el efecto de las gonadotropinas sobre la secreción de esteroides sexuales en las gónadas. El objetivo fue determinar el efecto del estrés prenatal sobre la distribución de las neuronas GnRH inmunomarcadas en la banda diagonal de Brocca, en el área preóptica y en el hipotálamo. Se utilizaron ratas Wistar divididas en dos grupos: control (C) y estrés (E), estresadas por inmovilización. Se sacrificaron a los 17 y 19 días de la gestación. Se obtuvieron fetos, los que se fijaron con Bouin. Se realizaron cortes de encéfalos (7 micras) a nivel medio sagital y se aplicó la técnica de inmunohistoquímica para la inmunolocalización de neuronas GnRH. Se observaron neuronas GnRH positivas principalmente en la banda diagonal de Brocca en 17 días C y E y en el área preóptica e hipotálamo en fetos de 19 días C y E. En todos los embriones estudiados el patrón morfológico de las neuronas GnRH es igual en animales controles y estresados.

Palabras clave: estrés prenatal, neuronas GnRH, encéfalos fetales.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia embrionaria depende del mantenimiento del equilibrio interno u homeostasis. El desarrollo del sistema nervioso central (SNC) está determinado por factores genéticos y ambientales que interactúan dinámicamente (Wadhwa *et al.* 2001).

El estrés es un estado de emergencia generado por el cuerpo que altera la homeostasis (Armario *et al.*, 2012). Si los factores ambientales son percibidos como estresantes, se pueden promover diversos procesos del desarrollo que podrían resultar en consecuencias perjudiciales para la salud, a corto y largo plazo. El estrés prenatal particularmente, es un factor epigenético capaz de inducir cambios en la estructura y funcionamiento del cerebro a nivel cognoscitivo, emocional y comportamental (Lemaire *et al.*, 2000, Weinstock, 2001).

En condiciones normales, existen diversas variables que determinan el control por parte del SNC de las funciones endócrinas de las cuales, las más importantes son las psicológicas, las sociales y las ambientales, así como los ritmos circadianos y ultradianos (luz-oscuridad). Sin embargo, cuando se produce una exposición a estímulos estresantes que supera el umbral de la estabilidad y tiene una duración suficiente, se produce una descompensación del organismo, fundamentalmente mediante la desregulación a nivel del cerebro de la función endocrina y de la retroalimentación ejercida por sus órganos blancos (Weinstock, 2001) lo que podría resultar en la desincronización de los ritmos biológicos y como consecuencia una desregulación de la función endócrina (Sealfon *et al.*, 1997). Esto podría influenciar sobre la función reproductiva, afectando el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG), a través de su inhibición en todos los niveles, mediado por varios componentes del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA). En ratas, los efectos que produce el estrés crónico no estarían mediados por una alteración directa de la función gonadal o por la acción de los esteroides gonadales, sino que se debería a una desregulación a nivel del SNC de las gonadotrofinas hipofisiarias. En este proceso, la hormona GnRH juega un rol muy importante al regular el eje HHA en todos los vertebrados (Sower, 1998; Carolsfeld *et al.*, 2000) y su liberación desde el hipotálamo determina la secreción de gonadotropina hipofisiaria que es crítica para determinar la activación gonadal en la etapa postnatal temprana y consecuentemente para la función reproductiva normal en mamíferos (Iain *et al.*, 2005).

En relación al eje HHA, se conoce que en situaciones de estrés las neuronas del núcleo paraventricular hipotalámicas sintetizan y secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que estimula la secreción a nivel hipofisiario de la hormona

liberadora de adrenocorticotropina (ACTH). A su vez, la ACTH estimula la secreción de glucocorticoides en la corteza adrenal (Weinstock, 2001, Smith *et al.*, 2006). El eje simpático-médulo-adrenal por su parte, libera finalmente adrenalina y noradrenalina para restaurar la homeostasis (Mayer *et al.*, 2011). Durante condiciones de estrés, la CRH actuaría como una hormona antireproductiva, inhibiendo la secreción directa o indirecta de la hormona GnRH (Rivier *et al.*, 1991).

Los glucocorticoides por su parte, poseen un rol importante en el desarrollo fetal, siendo los tejidos nerviosos fetales especialmente sensibles a los estímulos estresantes (Sandman *et al.*, 1997) Además se conoce que ejercen un efecto inhibitorio en las neuronas GnRH, en los gonadotropos hipofisarios y en las gónadas (Rivier *et al.*, 1991; McAdams *et al.*, 1986).

El principal rol de la GnRH además de participar en la regulación del eje HHG, es estimular la síntesis y liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) desde la hipófisis, con el objetivo de producir las gametas, (Roch *et al.*; 2011). Por esto, las neuronas GnRH merecen una atención especial, ya que juegan un rol primordial en el control de muchos aspectos relacionados a la función reproductiva de los vertebrados.

En base a los antecedentes analizados, se podría considerar al estrés prenatal como un factor capaz de inducir alteraciones en la estructura y funciones cerebrales alterando el desarrollo motor temprano, e interrumpiendo el curso de la diferenciación sexual (Henry *et al.*, 1994). Las consecuencias neurobiológicas del estrés en estadios tempranos del desarrollo podría promover la ocurrencia de problemas emocionales o comportamentales que podrían persistir e incrementar el riesgo de psicopatologías en adultos (Gressens *et al.* 1992; Weinstock, 2001).

El objetivo del trabajo fue determinar la distribución de las neuronas GnRH inmunomarcadas en la banda diagonal de Brocca, el área preóptica y el hipotálamo de fetos de madres estresadas crónicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Se utilizaron hembras primíparas de la cepa Wistar jóvenes (90 a 120 días de edad) de 200 a 300 grs. Se alojaron de a cuatro ejemplares por jaula en condiciones estándar de bioterio a temperatura de 22 ± 2 °C, fotoperiodo controlado, (12 hs. luz, de 7.30 a.m. a 7.30 p.m), humedad ambiente, con alimentación e hidratación ad-libitum (Las instalaciones del laboratorio fueron las adecuadas según la disposición 6344/96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Argentina. Para el manejo de los animales de laboratorio se

siguieron las conclusiones y recomendaciones de la reducción, refinamiento y reemplazo de animales de laboratorio proveniente de la declaración de Bologna-Russell and Burch, 1959. Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo a los principios y procedimientos de la Guía de Uso y Manejo de animales de Laboratorio (Publicación NIH n° 85-23, revisada en 1985, <http://www.nih.gov/sigs/bioethics>). Se realizó el ciclado de las hembras por medio de colpocitogramas en fresco y se determinó el día del estro. Se colocó luego un macho de la misma cepa, por el término de 12 a 18 horas, y se verificó la cópula por la presencia de espermatozoides en exudados en fresco de la vagina de la hembra, considerándose a éste el día cero de la preñez. Las hembras preñadas fueron separadas en dos grupos: Control (C) y Estrés (E).

Tratamiento experimental: A partir del cuarto día de la gestación, las hembras del grupo E fueron sometidas a sesiones de estrés por inmovilización en tubo, que consistió en colocarlas por 45 minutos en cilíndricos plásticos, 3 veces a la semana, durante la mañana a tiempos variables. Este tipo de estrés se caracteriza por ser intenso y si se aplica a tiempos variables corresponde a un estrés impredecible. Este proceso se realizó hasta el día del sacrificio. Las ratas de ambos grupos fueron sacrificadas a los días 17 y 19 de la gestación. Estos días fueron elegidos porque desde el día 17 hasta el 19 se observa el mayor desarrollo de neuronas GnRH. Se obtuvieron siete (7) ratas por cada estadio gestacional de cada grupo (n=21 por grupo). Los fetos fueron removidos y fijados en bouin y procesados de acuerdo con técnicas histológicas convencionales.

Inmunolocalización de GnRH: Los cortes histológicos de encéfalos fetales fueron incubados por 10 min en H₂O₂ al 3% para el bloqueo de la peroxidasa endógena. Luego, fueron incubados con el anticuerpo primario anti-GnRH (anti-conejo; LR1) durante toda la noche a 4°C seguido por la incubación con el anticuerpo secundario Vectastain-ABC KIT (Elite PK 6101 rabbit IgG) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con el complejo Avidina-Biotina-Inmunoperoxidasa (Complejo ABC, kit Vectastain, Laboratorio Vector) por 30 min. Finalmente, los cortes fueron revelados con 3-3'-diaminobenzidina (DAB).

RESULTADOS

Se observaron neuronas GnRH positivas en todas las muestras analizadas. Se observó una inmunomarca citoplasmática, difusa y perinuclear.

En embriones de 17 días C se observaron neuronas GnRH positivas en la zona que rodea al III ventrículo. En embriones de 17 días E, las neuronas GnRH positivas fueron inmunolocalizadas principalmente en el bulbo olfatorio y en la banda diagonal de Brocca.

En embriones de 19 días de ambos grupos estudiados (C y E), se observaron neuronas GnRH positivas principalmente en el área preóptica y en el hipotálamo donde se observan los axones inmunomarcados que se dirigen a la eminencia media. (Fig.1 C y D).

No se observaron diferencias en la intensidad ni en la morfología de las neuronas de la inmunomarca de GnRH entre los grupos C y E en ambas edades.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo, fueron seleccionados los embriones de 17 y 19 días de gestación. Esto concuerda con los días de mayor desarrollo de neuronas GnRH, las cuales se encuentran distribuidas en un continuo en el septo medio, el área diagonal de Brocca y en el hipotálamo con fibras que se extienden hacia la eminencia media y el órgano vasculosum de la lámina terminal (Ling Lim *et al.*, 2014).

El anticuerpo policlonal LR1 (Silverman *et al.*, 1990) utilizado en este trabajo nos permite afirmar que todas las neuronas inmunomarcadas corresponden a neuronas m-GnRH. Sin embargo, Quanbeck *et al.* (1997), utilizan dos anticuerpos: el LR1 y el GF6 (que marca otra forma molecular de la GnRH que tiene modificado o ausente el péptido C terminal), demostraron que existen dos poblaciones neuronales diferentes: 1) las **denominadas células tempranas, con un tamaño de 7 a 10 μm , que sólo se marcan con GF6** y que se encuentran en el epitelio olfatorio, el mesénquima y el cerebro anterior y 2) las células tardías **que son más grandes, de 7 a 18 μm , que se inmunomarcan con los anticuerpos GF6 y LR1;** y que poseen una distribución similar a la que se presenta en el organismo adulto, proponiéndose que serían las responsables de la regulación del eje HHG.

En este trabajo experimental se demostró que la morfología de las neuronas GnRH a los 17 y 19 días de la gestación, no presenta cambios en el grupo estrés. Por otro lado, al realizarse la selección al azar de tres embriones por camada y no determinarse el sexo de los mismos, nuestros hallazgos indicarían que en todos los embriones estudiados el patrón morfológico de las neuronas GnRH es igual en animales controles y estresados. Estos hallazgos son concordantes con los obtenidos por Wood *et al.* (1992) quienes afirman que la morfología, el número total y la distribución anatómica,

y de los procesos axonales es igual en ambos sexos y en todas las especies, no existiendo variación en esta población neuronal durante el periodo crítico de la diferenciación sexual en la segunda mitad de la gestación.

BIBLIOGRAFÍA

Armario A., Daviu N., Muñoz-Abellán C., Rabasa C., Fuentes S., Belda X., Gagliano H., Nadal R (2012) What can we know from pituitary–adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors? *Cell Mol Neurobiol.* 32: 749-758.

Carosfeld J., Powel J., Park M., Fisher W., Craig A., Chang J., Rivier J., Sherwood, N (2000) Primary Structure of three Gonadotropin-releasing Hormones, including a Novel form, from an ancient Teleost, Herring. *Endocrinol.* 141: 505-512.

Charil A., Laplanteb D., Vaillancourt C., Kinga S (2010) Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews.* 65:56-79.

Gressens P., Gofflot F., Van Maele-Fabry G., Misson I., Gadisseux I., Evrard P (1992) Early neurogenesis and teratogenesis in whole mouse embryo cultures. Histochemical, immunocytological and ultrastructural study of the premigratory neuronal-glia units in normal mouse embryo and in mouse embryos influenced by cocaine and retinoic acid. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 51: 206-219.

Henry C., Kabbaj M., Simon H., Lemoal M., Maccari S (1994) Prenatal stress increases the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol.* 6: 341-345.

Iain J., Sueli P (2005) Synthesis and secretion of GnRH. *Animal Reprod Sci.* 88: 29-55.

Lemaire V., Koehl M., Le Moal M., Abrous D (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 11032–11037.

MacAdams M., White, R., Chipps, B. (1986) Reduction of serum testosterone levels during chronic glucocorticoid therapy. *Ann. Intern. Med.* 129: 229-40.

Mayer N., Greco C., Bertuzzi M., Rodriguez N., Vivas A., Gauna H (2011) Inmovilization stress responses in adult rats exposed in utero to inmovilization. *Stress and health*. 27: 1-10.

Quabeck C., Sherwood N., Millar R., Terasawa E (1997) Two populations of luteinizing hormone releasing hormone neurons in the forebrain of the rhesus macaque during embryonic development. *J. Comp. Endocrinol*. 380: 293-309.

Rivier C., Rivest S (1991) Effects of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol. Reprod*. 45: 523-532.

Roch G., Busby E., Sherwood N (2011) Evolution of GnRH: diving deeper. *General and Comparative Endocrinol*. 171: 1-16.

Sandman C., Wadhwa P., Chicz-DeMet A., Dunkel-Schetter C., Porto M (1997) Maternal stress, HPA activity, and fetal-infant outcome. *Ann N Y Acad Sci* 814: 266-275.

Schwanzel-Fukuda M., Pfaff D (1989) Origin of luteinizing hormone-releasing neurons. *Nature*. 338 (6211): 161-164.

Sherwood N., Harry J., Warby G., Peute J., Ropland G (1993) Gonadotropin-Releasing Hormone, including a novel form in snook *Centropomus undecimelis*, in comparison with forms in black sea bass *Centropristis striata*. *Reg. Pept*. 46: 523-534.

Silverman A., Witkin J., Millar R (1990) Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of antibodies directed against GnRH and its precursor in hypothalamic neurons. *J. Histochem. Cytochem*. 38: 803-813.

Smith S., Vale W (2006) The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dial. Clin. Neurosci*. 8(4): 383-395.

Sower S (1998) Brain and pituitary hormones of Lampreys, recent finding and their evolutionary significance. *Amer. Zool.* 38: 15-38.

Stuart A, Tobel Bless E., Schawarting G (2001) Developmental aspect of the Gonadotropin-Releasing Hormone system. *Mol Cel Endocrinol.* 185: 173-184.

Wadhwa P., Sandman C., Garite T (2001) The neurobiology of stress in human pregnancy: implications for prematurity and development of the fetal central nervous system. *Prog. Brain Res.*, 133: 131-42.

Wei L., Tomoko S., Ishwars P (2014) Maternal dexamethasone exposure during pregnancy in rats disrupts gonadotropin-releasing hormone neuronal development in the offspring. *Cell tissue.* 355: 409-423.

Weinstock, M (2001) Alterations induced by gestation stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol.* 65: 427-451.

Wood R., Lehman M., Foster D (1992) GnRH neurons in the fetal Lamb hypothalamus are similar in males and females. *Neuroendocrinol.* 55: 427-433.

Wray S., Grant P., Gainer S (1989) Evidence that cells expressing LHRH mRNA are derived from progenitor cells in olfactory placode. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 8132-8136.

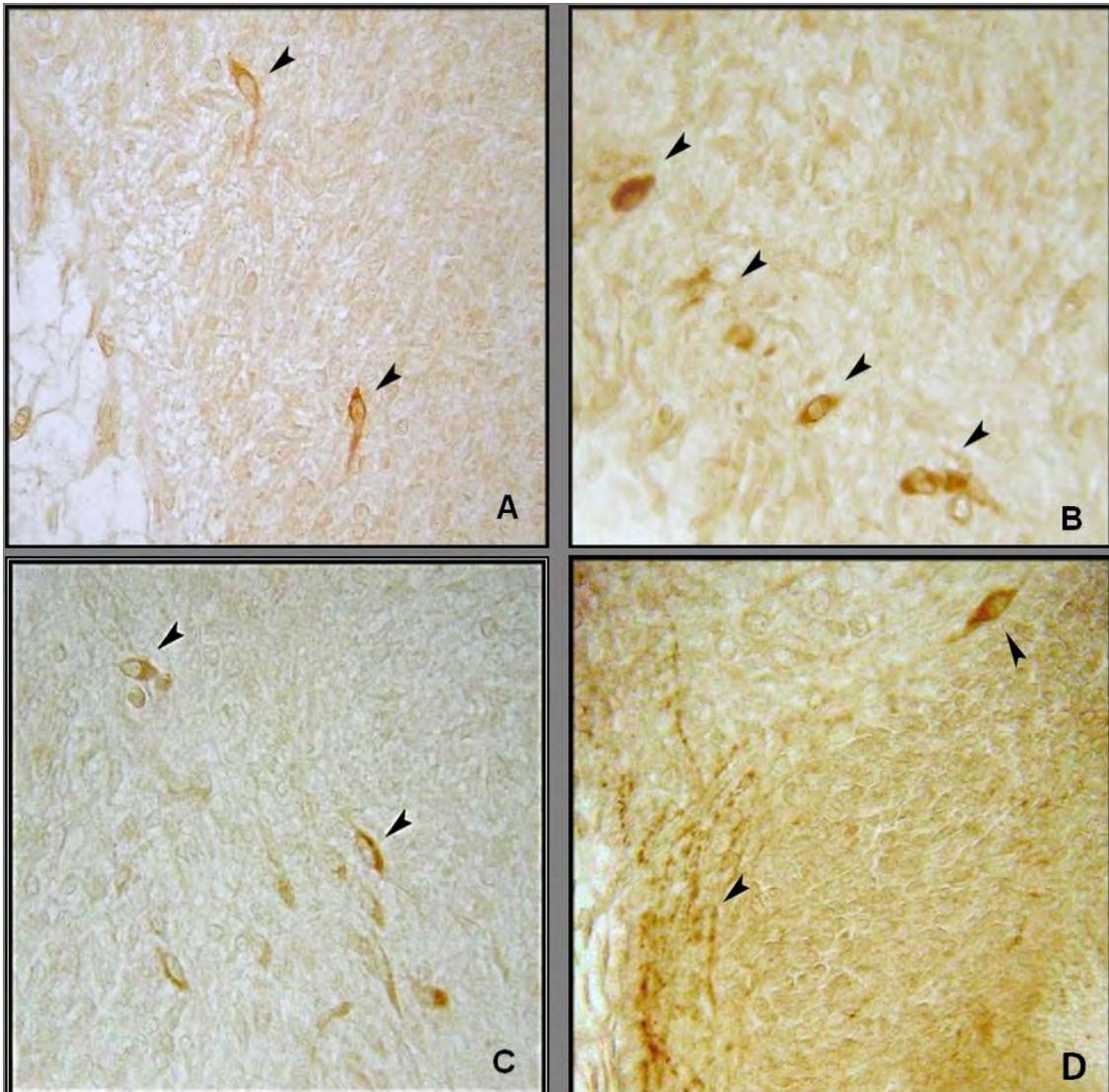


Figura 1. Microfotografía óptica de encéfalos fetales inmunomarcadas con GnRH (400x). Las flechas indican neuronas GnRH positivas. **A)** Neuronas GnRH positivas de 17 días C en el área que rodea al III ventrículo **B)** Neuronas GnRH positivas de 17 días E en el bulbo olfatorio y la banda diagonal de Brocca **C)** Neuronas GnRH positivas de 19 días C en el área preóptica y en el hipotálamo **D)** Neuronas GnRH positivas de 19 días E en el área preóptica y en el hipotálamo con axones que se dirigen a la eminencia media.