



UNAM

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA.**

**“ASPECTOS DE LA IMPORTANCIA DEL SISTEMA DE HORMONA
LIBERADORA DE GONADOTROPINAS – II Y SUS RECEPTORES
(GnRH-R-II)”.**

TESINA.

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO.

P R E S E N T A

ALFREDO RODRÍGUEZ JIMÉNEZ.

**Director de tesis: Dr. RODOLFO CÁRDENAS
REYGADAS.**

Los Reyes Iztacala. Tlalnepantla, Edo. de Méx.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA.

A la memoria de mi padre *Alfredo Rodríguez C.* y mi abuelo *Juan Jiménez C.* mil gracias.

A mis abuelos *Celestina C., J. Guadalupe R.* y *Carmen F.* gracias sus cuidados y su cariño durante tantos años.

A mi madre *Eva J.* por su gran ejemplo como mujer.

A mi hermana *Karina R.* por su grata compañía.

A *Itzel., Juan Angel F., Eva Sayil T* y *Emiliano Tenoch T.* gracias por sus risas, travesuras y ocurrencias.

A *Cecilia A.* por su compañía en los momentos mas difíciles de la vida.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. *Rodolfo Cárdenas R.*, por su gran amistad, asesoramiento y apoyo brindado a lo largo de este tiempo GRACIAS.

A la Biól. *Mónica Chávez M.* por su amistad y sabios consejos.

A la Dra. *Juana A. Luis D.* por sus aportaciones en la revisión del presente trabajo.

Al Dr. *Sergio Vaca P.* por sus comentarios del presente trabajo.

A la M en C. *Alba F. Márquez E.* por la revisión del presente trabajo.

A la *UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO* (FES-Iztacala), por permitirme ser parte de esta grandiosa institución.

A mi gran familia (*Jiménez y Rodríguez*) por su apoyo y comprensión.

A mis amigos y camaradas (perdón de antemano si omití a alguien): *Beatriz C. y Ernesto, Renata D., Francisco C., Eduardo C. y Claudia, Enrique P., Edgar N., Teresa G., Miriam N., Marcela R. y Paulo, Beta M., Giovanna A. y Sócrates A., Gabriela O., Gustavo V. y Claudia M., Joel Irineo T., Jonathan E., Adriana O., Cinthia B., Mari C.*

A toda la gente que conforma a la (extinta) C.R.A.P.A.

A TODOS AQUELLOS QUE DE ALGUNA FORMA ME HAN BRINDADO SU AMISTAD “GRACIAS TOTALES”.

ÍNDICE.

Resumen	1
Introducción	2
Justificación	4
Objetivos	4
Material y Método	4
Capitulo 1. Generalidades de la GnRH.	5
Capitulo 2. Función y localización	16
Capitulo 3. Biología molecular de la GnRH.	23
Capitulo 4. Receptores para GnRH.	27
Discusión	34
Conclusiones	37
Referencias	38
Anexo	48

RESUMEN.

La GnRH participa activamente en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, ya que es la encargada de la secreción y liberación de las hormonas gonadotropinas (GtHs: LH y FSH). A la fecha se han secuenciado 24 isoformas, la variante aislada originalmente en pollo (cGnRH-II) o sistema II (GnRH 2), está presente en todos los vertebrados a excepción de los peces agnatos.

Este sistema, se postula que fue el primero en desarrollarse durante la evolución de los vertebrados ejerciendo todas las funciones motoras y neuroendocrinas en los organismos, sin embargo, estas fueron remplazadas por los sistemas del nervio terminal (GnRH 3) y del cerebro anterior (GnRH 1).

En todos los organismos estudiados la cGnRH-II se localiza en el *tegmentum* del cerebro, medio teniendo una función de neurotransmisora y/o neuromoduladora. En algunas especies se encuentra además en otras áreas, como, en el hipotálamo, donde, participa en la secreción de las hormonas gonadotropinas y de la hormona de crecimiento.

La cGnRH-II al momento de ejercer su efecto en las células gonadotropas y somatotropas de la hipófisis utiliza receptores localizados en la membrana celular. Los receptores para GnRH pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), los cuales están constituidos por un dominio extracelular N-terminal, un gran dominio transmembranal y un dominio citoplasmático C-terminal. El dominio NH₂-terminal es seguido por 7 dominios transmembranales α -hélice necesarios para anclar al receptor en la membrana celular, estos dominios están interconectados por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares.

Los receptores se clasifican en tres tipos: tipo I, tipo II y tipo III. El tipo I es altamente sensible a la isoforma de mamífero (mGnRH), mientras el receptor tipo II muestra una clara preferencia por la cGnRH-II, siendo este su receptor afin. Todos los receptores en teleósteos tienen una preferencia a la isoforma de pollo, seguido por la isoforma de salmón y después por la tercera isoforma si es que existe.

INTRODUCCIÓN.

Uno de los retos que tuvieron los primeros organismos multicelulares fue la comunicación intercelular para poder actuar como un organismo y no sólo como un agregado de células individuales. Conforme se refinaron los mecanismos de esta comunicación, es posible que surgieran de manera casi simultánea la diferenciación celular y con ella la adquisición de un grupo de funciones específicas para grupos determinados de células. Una parte de dichas funciones, fue desarrollar sistemas que coordinaran la actividad integral del organismo, promoviendo respuestas tanto a estímulos externos como internos.

Así, aparecieron células que se especializaron en el control y la comunicación, basadas en el uso de sustancias que migran de una célula a otra y evocan respuestas particulares. A dichas sustancias se les denomina de manera genérica mensajeros, y como ejemplos tenemos a los neurotransmisores, las hormonas y factores de crecimiento.

La naturaleza química de los mensajeros es heterogénea, pues encontramos sustancias como el óxido nítrico (NO); aminas biógenas como la dopamina, la histamina y la serotonina; péptidos como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la somatostatina (SRIF o SS); proteínas como la hormona luteinizante (LH), la hormona de crecimiento (GH) y la insulina. También pueden encontrarse mensajeros de naturaleza lipídica como los esteroides (glucocorticoides, mineralocorticoides, esteroides sexuales y la vitamina D), o de otros tipos de grasas como las prostaglandinas, las prostaciclina y otras.

En general, los mensajeros utilizan receptores que median sus efectos en las células blanco.

Los receptores pueden encontrarse en la membrana celular y activar un sistema de mensajeros intracelulares, denominados segundos mensajeros, que son los encargados de promover las respuestas de las células diana.

De este tipo de receptores podemos mencionar a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que se caracterizan por que poseen un extremo amino terminal extracelular, siete dominios transmembranales, tres asas extracelulares, tres asas intracelulares y el extremo carboxilo terminal intracelular. También, entre los receptores ubicados en la membrana, se encuentra otra categoría que se le llama receptores tirosincinasas (RTK), los cuales tienen un dominio extracelular en el cual se reconoce al mensajero, un dominio transmembranal y un dominio intracelular que posee actividad de cinasa y es autocatalítico. La característica de esta región es la presencia de residuos del aminoácido tirosina que son las partesceptoras de los grupos fosfato.

Además de estos receptores de membrana, se presenta otro grupo cuyos miembros se conocen como receptores serin-treonin cinasa, que tienen una morfología similar a los RTKs, pero en su parte intracelular las fosforilaciones se realizan sobre residuos de los aminoácidos serina o treonina.

Otra vía es que los mensajeros intercelulares pueden activar directamente canales iónicos presentes en la membrana celular.

Además, algunos mensajeros utilizan moléculas que se encuentran en el interior de la célula, por lo cual se dice que se sirven de receptores intracelulares. Estos tienen una ubicación citoplásmica o nuclear, y en términos generales, actúan directamente sobre el genoma.

La mayoría de los mensajeros utilizan receptores de membrana o receptores intracelulares.

La reproducción, como un evento esencial para las especies, no ha sido ajena al uso de mensajeros que coordinen el proceso, y en ello, participan de manera muy clara el sistema nervioso, en especial el hipotálamo, la hipófisis, las gónadas y sus conductos asociados. La participación de hormonas y factores parácrinos regulan la gametogénesis y otros fenómenos reproductivos. Entre estos mensajeros se destaca la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que además de jugar un importante papel en la reproducción, posee otras funciones, y es producida también en otras regiones del organismo.

A lo largo de la evolución, la GnRH ha variado ligeramente en su secuencia de aminoácidos, generando lo que se denominan isoformas. Actualmente, se proponen nuevos criterios de clasificación de dichas isoformas y de sus receptores.

JUSTIFICACIÓN.

Entre los mensajeros, un grupo de moléculas que ha llamado poderosamente la atención, es una hormona que originalmente se descubrió en el hipotálamo y se le llama hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), nombre que le fue dado por su capacidad de estimular la liberación de gonadotropinas de la hipófisis, vinculándose estrechamente por este hecho, con los fenómenos reproductivos.

Con el desarrollo de la investigación se ha determinado una distribución de GnRH más allá de áreas hipotalámicas, con otras funciones además del papel neurohormonal originalmente descrito.

A la fecha, se han descrito 24 isoformas de la hormona formando una familia. Ahora bien al momento de hablar de las GnRHs nos referimos a estas como una sola y no como un conjunto es debido desde su descubrimiento década de los 50's, se hace hincapié a la que tiene la función de liberación de las gonadotropinas y además no se pensaba que existiera mas de una isoforma.

También se han descrito varios subtipos de receptores de membrana que median sus efectos. El conocimiento acerca de la estructura de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de su receptor GnRHR, al igual de las relaciones que existen entre ellos son esenciales para el entendimiento de su papel y función en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) y en la fisiología reproductiva. Por estas razones nos resulta importante el realizar un trabajo en el cual se resuman los principales hallazgos de la isoforma aislada originalmente del encéfalo de pollo (cGnRH-II) y su receptor afin.

OBJETIVO: Realizar un análisis con la información existente acerca de la cGnRH-II y su receptor afin para la elaboración de un escrito.

METODOLOGÍA.

Se realizará una búsqueda de información en revistas de mayor impacto en las áreas de endocrinología, fisiología, bioquímica y biología molecular, con la finalidad de reunir información de importancia acerca de la hormona liberadora de gonadotropinas en especial de la isoforma de pollo o cGnRH-II y de su receptor afin a dicha hormona, en estudios hechos en especies de vertebrados y con mayor énfasis en peces teleósteos.

Capítulo 1. Generalidades de la GnRH.

Isoformas de GnRHs y Nomenclatura.

Factores ambientales como: temperatura, fotoperíodo, variaciones en la osmolaridad, son percibidos por el organismo a través de receptores, los cuales comunican dichas variaciones al sistema nervioso central y posteriormente, al eje endocrino reproductivo. Esta información es procesada y enviada a diferentes partes del sistema nervioso, especialmente, a algunos núcleos del hipotálamo, donde se modifica la producción y la liberación de hormonas, entre las cuales se encuentra la GnRH, la cual es un decapeptido que estimula la secreción de las hormonas gonadotropinas (GtH) (Kah y col., 1993; Cárdenas, 1996). Originalmente, se le conocía con el nombre de hormona secretora de la hormona luteinizante (LHRH), referida por su efecto en la estimulación de la secreción de la LH (Dubois, y col., 2002).

Sin embargo, la GnRH no es una única molécula, ya que pertenece a una familia de decapeptidos que mantienen una elevada conservación en los diversos grupos y a la fecha, se han reportado 24 isoformas (Gorbman y Sower, 2003) cada una de ellas, ha sido nombrada acorde con la especie de la cual fueron primeramente aisladas (cuadro 1). Su estructura primaria fue predicha en la década de los 50's, pero no fue aislada hasta los años 70's, determinándose en mamíferos, la primera isoforma de GnRH (mGnRH; Matsuo y col., 1971). Desde su descubrimiento en 1971, se han caracterizado y secuenciado 14 isoformas distintas de GnRH en el cerebro de vertebrados, 9 en protocordados y una en invertebrados. (Adams y col., 2003). Específicamente en vertebrados, se han descrito: dos en ciclóstomos, denominándose GnRH de lamprea I y GnRH de lamprea III (IGnRH-I y IGnRH-III; respectivamente, Sower y col., 1993). En condroictios, (dfGnRH; Lovejoy y col., 1992); seis GnRHs en peces teleósteos, en salmón (sGnRH, Sherwood y col., 1983), en el pez gato (cfGnRH, Ngamvongchon y col., 1992), en la dorada (sbGnRH, Powell y col., 1994), en el arenque (hrGnRH, Carosfeld y col., 2000) y en medaka (mdGnRH, Okubo y col., 2000), en el pez blanco (wfGnRH, Adams y col., 2002); una en rana (rGnRH, Yoo y col., 2000); dos isoformas de GnRH en aves, ambas descritas en el pollo (cGnRH-I, King y Millar, 1982; cGnRH-II, Miyamoto y col., 1984); y dos en mamíferos, que se manifiestan en el cerdo (mGnRH, Matsuo y col., 1971; Burgus y col., 1972) y en el cobayo (gpGnRH, Jiménez-Liñán y col., 1997). En protocordados, se han descrito 9 isoformas de GnRH en tunicados, tGnRH-I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX (Powell y col., 1996; Adams, 2003). Recientemente, en un invertebrado, el pulpo, también se ha aislado

y caracterizado una molécula de 12 aminoácidos con estructura y funciones similares a la GnRH (oGnRH, Iwakoshi y col., 2002).

Por otra parte, existe una variante de la isoforma mGnRH que se origina del mismo gen y es producida por postraduccion enzimática. Esta variante se identifica como hidroxiprolina mGnRH ([Hyp] GnRH), y fue encontrada en ratas, hamsters y en ranas (Montaner y col 2001).

En todos los cordados, estructuralmente la GnRH esta formada por 10 aminoácidos, teniendo un residuo piroglutámico en su extremo amino terminal (pGlu) y una glicina amidada en su extremo carboxilo terminal (Gly-NH₂) (Peter y col, 1990). La longitud del decapeptido y cinco aminoácidos de la molécula se han conservado, ello abarca ambos extremos de la molécula, que han permanecido estables en todas las isoformas encontradas en vertebrados incluyendo la de humano. La conservación de su estructura refleja la importancia de esta hormona para el éxito reproductivo y por lo tanto, para la supervivencia de las especies (Ikemoto y Park, 2005). La conservación de los extremos son importantes para la bioactividad y conformación del péptido, particularmente lo relacionado con la unión al receptor, resistencia a la degradación enzimática y los eventos requeridos con la secreción de gonadotropinas (Gorbman y Sower, 2003). La posición 8 en la cadena de aminoácidos es la que presenta más variabilidad seguida por la posición 6, 5 y 7. La considerable variación en la posición 8 sugiere que cualquier residuo es tolerado en esta posición (Millar, 2005).

Con el descubrimientos de las diferentes isoformas, se han propuesto nomenclaturas en donde se ha utilizado la información obtenida de la estructura primaria. Una de estas nomenclaturas, utiliza como isoforma base o estándar a la mGnRH y todas las demás variantes son nombradas de acuerdo a la alteración y la posición en la cadena de aminoácidos, por ejemplo cGnRH-II es nombrada [His⁵, Trp⁷, Tyr⁸] GnRH. Recientemente, han surgido terminologías alternas, en donde se propone que, GnRH1 se nombra a la variante presente, principalmente, en el área hipotalámica; GnRH2 para la forma mesencefálica (cGnRH-II) y GnRH3 en el caso de la existencia de una tercera forma (generalmente presente en el cerebro de peces teleósteos, sGnRH) (Fernald y White, 1999). Sin embargo, esta nomenclatura no distingue diferentes variantes encontradas en el hipotálamo de varias especies. Otra nomenclatura se basa en la localización y función de las isoformas, en este caso MB-GnRH (cerebro medio GnRH) corresponde a cGnRH-II; VF-GnRH (cerebro ventral anterior GnRH) la cual es la forma hipofisiotrópica especie-especifica y TN-GnRH (nervio terminal GnRH) para sGnRH (Dubois y col., 2002).

Isoforma GnRH	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
mGnRH	Pglu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
gpGnRH	*	Tyr	*	*	*	*	Val	*	*	*
cGnRH-I	*	*	*	*	His	*	Trp	Gln	*	*
rGnRH	*	*	*	*	*	*	*	Trp	*	*
sbGnRH	*	*	*	*	*	*	*	Ser	*	*
sGnRH	*	*	*	*	*	*	Trp	Leu	*	*
mdGnRH	*	*	*	*	Phe	*	*	Ser	*	*
cfGnRH	*	*	*	*	His	*	*	Pro	*	*
hrGnRH	*	*	*	*	His	*	*	Ser	*	*
wfGnRH	*	*	*	*	*	*	Met	Asn	*	*
dfGnRH	*	*	*	*	His	*	Trp	Leu	*	*
cGnRH-II	*	*	*	*	His	*	Trp	Tyr	*	*
IGnRH-III	*	*	*	*	His	Asp	Trp	Lys	*	*
IGnRH-I	*	*	Tyr	*	Leu	Glu	Trp	Lys	*	*
tGnRH-I	*	*	*	*	Asp	Tyr	Phe	Lys	*	*
tGnRH-II	*	*	*	*	Leu	Cys	His	Ala	*	*
tGnRH-III	*	*	*	*	*	Glu	Phe	Met	*	*
tGnRH-IV	*	*	*	*	Asn	Gln	*	Thr	*	*
tGnRH-V	*	*	*	*	*	Glu	Tyr	Met	*	*
tGnRH-VI	*	*	*	*	Lys	*	Tyr	Ser	*	*
tGnRH-VII	*	*	*	*	*	Ala	*	Ser	*	*
tGnRH-VIII	*	*	*	*	Leu	Ala	*	Ser	*	*
tGnRH-IX	*	*	*	*	Asn	Lys	*	Ala	*	*
oGnRH	*	Asn Tyr	Phe	*	Asn	*	Trp	His	*	*

Cuadro 1. Estructura de las isoformas de GnRH en vertebrados e invertebrados. Estas son las 24 formas conocidas: 14 en vertebrados y 10 en invertebrados (modificado de Somoza y col., 2002; Gorbman y Sower, 2003; Lethimonier y col., 2004, Tsai, 2005; Guilgur y col., 2006).

De todas las variantes estructurales de GnRH, la isoforma cGnRH-II o GnRH 2, está universalmente presente en todos los vertebrados desde los peces hasta humanos, a excepción de los peces agnatos (cuadro 2) y no tiene modificación en su estructura. Esta isoforma fue aislada del cerebro del pollo por Miyamoto y col. (1984). La estructura ha permanecido sin cambios en los últimos 500 millones de años. Esta marcada conservación indica una importante función para el organismo (Sealfon y col, 1997; Yu y col, 1997; Millar, 2003).

<p>Condricties: <i>Hydrolagus colliei</i> <i>Dasyatis sabina</i> <i>Squalus acanthias</i></p>	<p>Amphibia: <i>Taricha granulosa</i> <i>Ambystoma graciele</i> <i>Xenopus laevis</i> <i>Rana catesbiana</i> <i>Rana esculenta</i> <i>Rana pipiens</i> <i>Rana ridibunda</i> <i>Hyla regilla</i> <i>Pachymedusa dacnicolor</i></p>
<p>Osteicties: <i>Calamoichthys calabaricus</i> <i>Lepisosteus spepatula</i> <i>Acipenser trasmontanus</i> <i>Acipenser gueldenstaedti</i> <i>Patodon buchholzi</i> <i>Gnathonemus petersii</i> <i>Chitala chitala</i> <i>Osteoglossum bicirrhosum</i> <i>Scleropages jardin</i> <i>Anguilla anguilla</i> <i>Clupea harengus</i> <i>Clarias macrocephalus</i> <i>Clarias gariepinus</i> <i>Coregonus clupeaformis</i> <i>Oncorhynchus keta</i> <i>Oncorhynchus mikiis</i> <i>Oncorhynchus nerka</i> <i>Oncorhynchus massou</i> <i>Carassius auratus</i> <i>Gnathopogon caeruleus</i> <i>Brachydanio rerio</i> <i>Rutilus rutilus</i> <i>Chanos chanos</i> <i>Prochilodus lineatus</i> <i>Piaractus mesopotamicus</i> <i>Mugil cephalus</i> <i>Poecilia latipina</i> <i>Xiphophorus maculatus</i> <i>Xiphophorus helleri</i> <i>Odontesthes bonariensis</i> <i>Odontesthes hatchery</i> <i>Oryzias latipes</i> <i>Synbranchus marmoratus</i> <i>Sebastes rastrelliger</i> <i>Sparus aurata</i> <i>Centropomus undecimalis</i> <i>Haplocromis burtoni</i> <i>Oreochromis mossambicus</i> <i>Oreochromis niloticus</i> <i>Lepomis gibbosus</i> <i>Pagrus major</i> <i>Pagrus pagrus</i> <i>Acanthopagrus schlegelii</i> <i>Opleganthus fasciatus</i> <i>Morone saxatilis</i> <i>Micropogonias furnieri</i> <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Pseudochanna georgianus</i> <i>Chaenocephalus aceratus</i> <i>Notothenia rossi</i> <i>Scophthalmus maximus</i> <i>Verasper moseri</i> <i>Neoceratodus forsteri</i> <i>Protopterus annectens</i> <i>Lepidosiren paradoxa</i></p>	<p>Reptilia: <i>Pseudemys scripta</i> <i>Trachemys scripta</i> <i>Anolis carolinensis</i> <i>Cordylus nigrus</i> <i>Podarcis sicula</i> <i>Calcides ocellatus</i> <i>Tupinambis merinae</i> <i>Thamnophis sirtalis perentialis</i> <i>Alligator mississippiensis</i></p>
	<p>Aves: <i>Gallus gallus</i> <i>Melleagris gallopavo</i> <i>Coturnix japonica</i> <i>Sturnus vulgaris</i> <i>Melospiza melodia</i> <i>Strutio camelus</i></p>
	<p>Mammalia: <i>Tachyglossus aculeatus</i> <i>Monodelphis domestica</i> <i>Trichosurus vulpecula</i> <i>Macropus eugenii</i> <i>Isoodon macrorurus</i> <i>Dasyurus vevevrius</i> <i>Suncus murinus</i> <i>Tupaia glis belangeri</i> <i>Chrysochoris asiatica</i> <i>Mesocricetus auratus</i> <i>Hydrochaeris hydrochaeris</i> <i>Macaca speciosa</i> <i>Macaca mulata</i> <i>Homo sapiens</i></p> <p>Cuadro 2. Especies en donde se encuentra distribuida la isoforma cGnRH-II (modificado de Somoza y col., 2002).</p>

Origen Embriológico de los Sistemas de GnRH.

Tomando en cuenta datos anatómicos, embriológicos, junto con estudios bioquímicos y moleculares se ha propuesto la creación de sistemas para dar una explicación del origen de las neuronas que sintetizan las diferentes isoformas de GnRH (neuronas-GnRH) en el cerebro (Muske, 1997).

Estos grupos celulares o sistemas difieren en su localización y distribución (Fernald y White, 1999). Además, se pueden nombrar con base a su localización, por ejemplo: la isoforma hipotalámica es conocida como GnRH 1, la isoforma del cerebro medio es GnRH 2 y la isoforma del nervio terminal (TN) es GnRH 3 (Fig. 1) (Wierman y col., 2004; Whitlock, 2005).

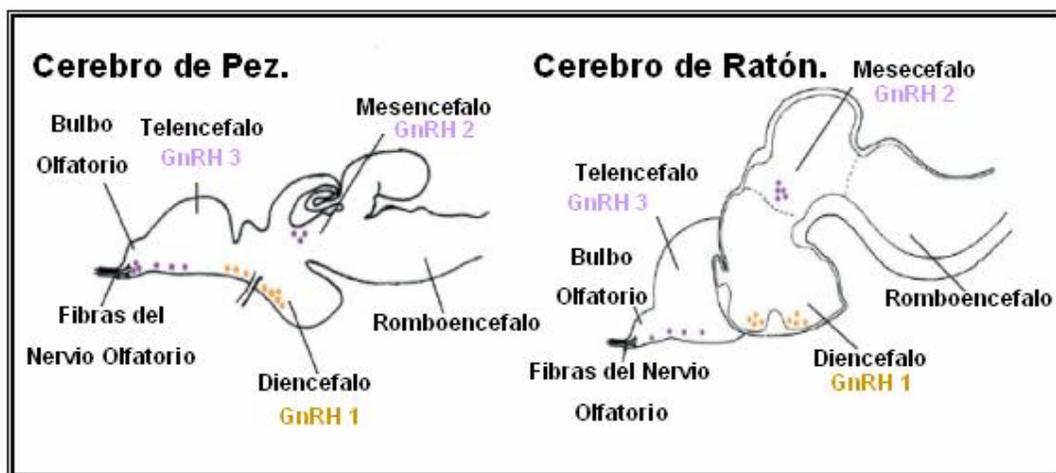


Fig. 1. Esquemas donde se observan la distribución y localización de la GnRH 1, GnRH 2 y GnRH 3 en el cerebro de pez y de ratón (modificado de Whitlock, 2005).

Las células del sistema GnRH 3 o nervio terminal septo-preóptico, tienen su origen embriológico en la cresta neural de la región craneal y expresan diferentes variantes de acuerdo con la especie, por ejemplo, mGnRH en muchos mamíferos, cGnRH-I en aves y sGnRH en salmónidos (Sherwood y col., 1997). En este sistema, la mayor parte de la GnRH se encuentra localizada desde el nervio terminal (TN) hasta la parte anterior del hipotálamo. Algunas neuronas-GnRH han sido también encontradas en el bulbo olfativo a lo largo del nervio terminal y en el hipocampo en mamíferos (González-Martínez y col., 2001).

Al segundo sistema (GnRH2), también se le conoce como sistema cGnRH-II debido a que esta es la única isoforma que aquí se expresa. En todos los gnatostomados está presente en un grupo de neuronas-GnRH localizadas en el diencéfalo posterior y en la parte rostral del mesencéfalo, y estas se diferencian tempranamente de un primordio germinativo del cerebro medio (González-Martínez y col., 2001; Gopinath y col., 2004).

En peces óseos la distribución es más compleja, ya que frecuentemente expresan tres isoformas y se encuentran localizadas en áreas muy específicas de cerebro (Stefano y col., 2000). En estas especies, cGnRH-II es expresada por neuronas-GnRH del cerebro medio, sGnRH esta localizada en el ganglio del nervio terminal (TNG) y una GnRH especie-específica, la cual corresponde al sistema GnRH 1 y esta presente generalmente en el área preóptica y en el hipotálamo (Dubois y col., 2002). Las neuronas-GnRH de este sistema se originan de la región del precursor que da origen a la placa de la hipófisis anterior y posteriormente migran a su posición original (Lethimonier y col., 2004).

En el cerebro de primates existen evidencias de una tercera isoforma. Las neuronas-GnRH que expresan mGnRH se encuentran en la región olfativa, en el área preóptica, en el hipotálamo y alrededor del ventrículo lateral (Sherwood, 1997), la cGnRH-II se encuentra en el cerebro medio (Leisheid y col., 1997) y una tercera forma que aun no ha sido identificada en el área preóptica (Quanbech y col., 1997).

Las neuronas-GnRH, son derivados de un grupo de células progenitoras localizadas en el compartimiento nasal (VNO) y migran a lo largo del sistema olfativo a través del septo nasal y la placa cribiforme (CP) a sus destinos en el cerebro anterior (CP) (Fig. 2).

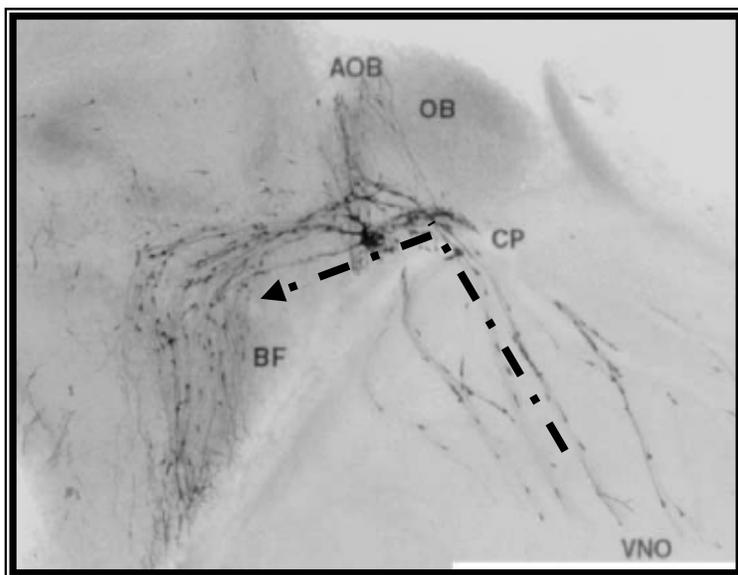


Fig. 2. Ruta migratoria (flecha) que siguen las neuronas-GnRH desde el compartimiento nasal (VNO) hasta sus destinos en el cerebro anterior (BF). (modificato de Tobet, y col., 2001).

A lo largo de la ruta migratoria muchos factores son importantes para el desarrollo. Algunas clases de moléculas han empezado a ser estudiadas por su influencia potencial en el proceso de migración. Estas se pueden clasificar en dos tipos: las relacionadas con la comunicación en la superficie celular (receptores de membrana, moléculas de adhesión, moléculas de la matriz extracelular (ECM), etc) y las relacionadas con la comunicación celular a distancia (neurotransmisores, péptidos, moléculas quimioatrayentes o repelentes) (Tobet y col., 2001).

Las moléculas asociadas con las interacciones en la superficie celular podemos encontrar a los glicoconjugados con cadenas de carbohidratos que contienen una galactosa terminal, los cuales son expresados temporalmente y espacialmente en las fibras olfatorias y guían a las neuronas-GnRH en el proceso de migración (Bless y col., 2000). De las moléculas asociadas con la comunicación celular a distancia, se ha observado que el ácido gamma-aminobutírico (GABA) está asociado con los patrones de migración de las neuronas-GnRH ya que influye directamente en la posición y organización de estas (Tobet y col., 1996). Recientes datos sugieren que la molécula netrin-1 también juega un papel en guiar los axones que dirigen a las neuronas-GnRH durante el desarrollo embrionario (Schwartz y col., 2001).

Síntesis de GnRH.

La hormona liberadora de gonadotropinas es sintetizada por células neurosecretoras mediante un proceso enzimático y empaquetadas en gránulos de almacenamiento. En mamíferos, aves, reptiles y anfibios, la hormona es secretada dentro del sistema portal por terminales nerviosas de la eminencia media y llegan a la parte anterior de la glándula hipofisiaria. En peces la secreción es vía directa, ya que las fibras neurosecretoras inervan directamente a las células gonadotropas de la hipófisis anterior (Chang y Jobin, 1994).

La GnRH se sintetiza en forma de un precursor que recibe el nombre de prepro-GnRH. Por el análisis de su estructura (Fig. 3), se deduce que tras la escisión del péptido señal, el residuo de ácido glutámico de la porción amino terminal de la GnRH se cicliza para producir ácido piroglutámico. Entonces, la GnRH se separa del GAP al escindirse en la secuencia de los aminoácidos dibásicos del sitio de procesamiento (Lys-Arg) mediante la acción de endopeptidasas y la carboxipeptidasa E. El grupo carboxilo terminal de la molécula (Gly-Gly) se modifica por acción de la α -peptidil-glicina monooxigenasa, que amida al grupo carboxilo terminal (Gly-NH₂) del dcapeptido ya activo. A continuación, la GnRH y el GAP se almacenan en gránulos de secreción hasta su uso. Se ha sugerido

que el GAP esta involucrado en la regulación de prolactina (Wetsel y col., 1991; Wetsel y Srinivasan, 2002).

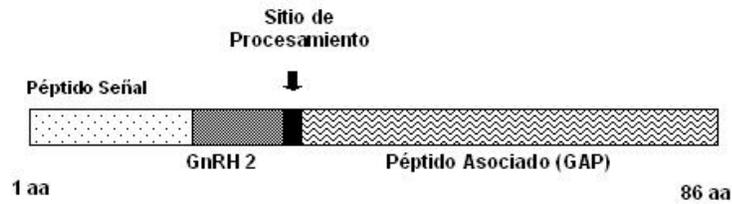


Fig. 3. Estructura de la preprohormona para la isoforma de pollo (cGnRH-II) (modificado de Kuo y col., 2005).

El gen que codifica para la prepro-GnRH-II consiste de un exón 5' sin traducir y tres exones codificantes, con el péptido codificado dentro del exón 2. En el humano, se observaron e identificaron múltiples elementos reguladores dentro del exón 1, incluyendo, 2 sitios de unión E-box con función de estimular la transcripción del gen. El péptido señal contiene un centro hidrofóbico. Este centro esta precedido por un residuo cargado positivamente (Lys o Arg). El sitio de procesamiento seguido del decapeptido para GnRH está completamente conservado. El extremo C-terminal consiste de un sitio aminoácido dibásico (Lys-Arg, Arg-Arg, Lys-Lys o Arg-Lys), el cual, representa típicamente un sitio unión enzimática para el procesamiento (Yu y col., 1997).

Distribución Taxonómica de GnRHs.

Tomando en consideración la distribución taxonómica de las variantes de GnRH en tetrápodos, dos isoformas han sido identificadas en áreas del sistema nervioso central: cGnRH- II en áreas del cerebro medio y una isoforma secretora en el cerebro anterior, en mamíferos, estas variantes puede ser mGnRH, [Hyp⁹] mGnRH (isoforma hidroxilada) o gpGnRH; en aves y reptiles esta representada por cGnRH-I y finalmente en anfibios por mGnRH o rGnRH (Montaner y col, 2001; Muske, 1997; Yoo y col., 2000).

Los mismos patrones de distribución se observan en especies de teleósteos donde la variante hipofisiotrópica está representada por mGnRH en anguiliformes, mGnRH o sGnRH en osteoglosiformes, sGnRH en salmoniformes y cipriniformes; y cfGnRH en siluriformes (Okubo y col, 1999, Okubo y Aida, 2001; Dubois y col., 2001). En especies en las cuales se han identificado 3 isoformas, se ha observado que expresan cGnRH-II, sGnRH y una tercera forma, la cual, se considera como la variante-especifica, que puede ser: hrGnRH en clupeiformes, wfGnRH en salmoniformes, pgGnRH en anteriniformes,

sibranquiformes, beloniformes y ciprinodontiformes; y sbGnRH en charaniformes, perciformes, pleuronectiformes y tetradontiformes (Somoza y col., 2002; Lethimonier y col., 2004; Sherwood y Adams, 2005).

Aspectos evolutivos de GnRH.

Dubois y col. (2002) hacen una propuesta evolutiva para las diferentes isoformas de GnRH. Esta toma en cuenta los siguientes aspectos: la presencia de algunas isoformas moleculares de GnRH dentro de una misma especie, su distribución filogenética y los descubrimientos de nuevas isoformas. Con estos criterios se construyó una propuesta de un árbol evolutivo. Primeramente, al considerar la distribución filogenética de las isoformas y la comparación de los precursores de la hormona, el modelo da como resultado dos linajes principales: el linaje de cGnRH II y el linaje de mamíferos. cGnRH II es la isoforma que apareció en la evolución temprana de los vertebrados y representa el linaje más conservado. Adicionalmente, se propone que un segundo linaje puede incluir a la mGnRH, la cGnRH I, la gpGnRH, la rGnRH y las diferentes isoformas existentes en peces. La presencia de 2 o más isoformas de GnRH dentro de una especie sugiere que, ambos linajes son, probablemente derivados de la duplicación genética en la evolución temprana de vertebrados. La estructura similar en los genes para GnRH es una evidencia importante de la hipótesis de duplicación del gen. El lugar que pudieran ocupar las GnRHs de lamprea y procordados, no es claro en este modelo. La cGnRH II está probablemente precedida por la isoforma de tunicados y lamprea, por lo cual, la IGnRH III es el ancestro putativo de la cGnRH II. La dfGnRH posiblemente deriva del linaje de cGnRH II, ya que estas isoformas difieren solamente en un aminoácido. De igual manera, las variantes sbGnRH y mdGnRH y aquellas existentes en vertebrados superiores como: rGnRH, cGnRH I y gpGnRH, se encuentran estrechamente relacionadas con mGnRH, por lo que, se ha postulado el mismo origen. Sin embargo, cuando consideramos la localización y función de las diferentes isoformas dentro de los Osteictios, tenemos que hrGnRH, sGnRH, sbGnRH y mdGnRH pueden ser localizadas en el cerebro ventral anterior y tienen una función hipofisiotrópica similar a las otras GnRHs en el linaje de mGnRH. Si comparamos los genes de los precursores para GnRH, el resultado es que los genes para la sGnRH se pueden situar como un grupo separado. La ubicación de esta variante de la hormona en el TN y una función diferente, han permitido el proponer un linaje separado para salmón que surgió durante la evolución de los teleósteos (Fig. 4).

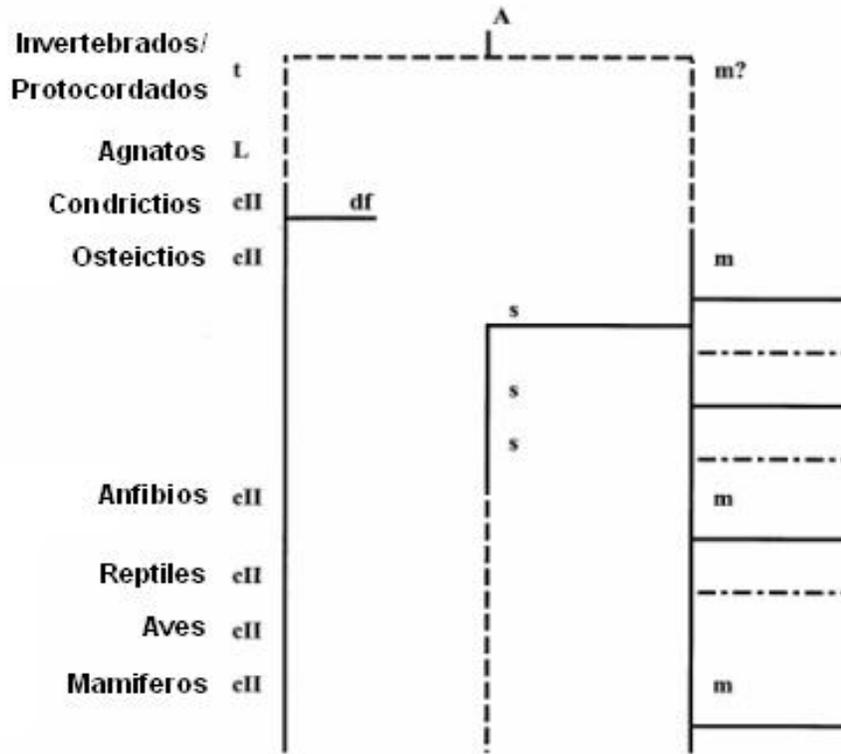


Fig. 4. Árbol hipotético evolutivo. Los tres linajes están discernidos: el linaje de la isoforma de cGnRH II, el linaje de la isoforma de mamífero y el linaje de la isoforma de salmón. Las líneas punteadas indican un origen incierto. Abreviaciones: forma ancestral (A); cGnRH II (cII); dfGnRH (df); IGnRH (L); mGnRH (m); tGnRH (t) (modificado de Dubois y col., 2002).

Capítulo 2. Función y localización.

Funciones de la GnRH.

GnRH es un neuropeptido con un papel clave en el control de la reproducción en todos los vertebrados y es esencial para la gametogénesis y la esteroidogénesis gonadal (Counis y col., 2005). También es un elemento clave en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada. La función mejor conocida es la síntesis y secreción de las hormonas gonadotropinas (GtH: FSH y LH) en la glándula hipofisiaria de vertebrados desde lampreas hasta humanos (Sower y Kawachi, 2001). Esta acción pudo haber co-evolucionado con el desarrollo de la glándula hipofisiaria (Peter y col., 1990).

Debido a que la GnRH cuenta con una amplia distribución en los tejidos de vertebrados, se ha propuesto que cumple diversas funciones, incluyendo la neuroendocrina (ej. en la secreción de la hormona de crecimiento, por parte de las células somatotropas de la hipófisis), paracrina (ej. en placenta y gónadas), autocrina (ej. células del sistema inmune, células de cáncer de próstata) y neurotransmisor y/o neuromodulador (ej. para la regulación del comportamiento reproductivo y la maduración sexual en vertebrados-modula la recepción quimiosensorial de feromonas y otros olores) (Dellovade y col., 1998; Millar, 2003; Wirsig-Wiechmann, 2001).

En teleósteos, algunos reportes indican que la hormona está involucrada en el control, de la hormona de crecimiento *in vivo* e *in vitro* (Li y col., 2002), de la prolactina en *Oreochromis mossambicus* (Weber y col., 1997), la somatolactina en *Oncorhynchus mykiss* (Karizawa y col., 1997) y en *Oncorhynchus nerka* (Taniyama y col., 2000) de ambas hormonas en *Odontesthes bonariensis* (Stefano col., 1999) y de la hormona tiroidea en *Channa gachau* y en *Cirrhinus mrigala* (Roy y col., 2000).

En las especies que tienen dos sistemas, se sabe que la isoforma especie-específica, la cual predomina en el hipotálamo, es relacionada con el control de la función de la hipófisis, en cambio la isoforma cGnRH-II es expresada por neuronas del cerebro medio y puede jugar un papel como neurotransmisor y/o neuromodulador. Se ha sugerido que cGnRH-II es secretada con el comportamiento reproductivo en peces (Ogawa y col., 2004; Okuzawa y col., 2003), en mamíferos (Kauffman y Rissman, 2004; Rissman, 1996) y aves (Sharp y col., 1990).

También cGnRH-II esta involucrada en la regulación de la función de la hipófisis en algunas especies de teleósteos. Esta hormona fue identificada como segunda o tercera isoforma en la hipófisis, de tilapia (Weber y col., 1997) y de arenque (Carolsfeld y col., 2000), induciendo una buena actividad de la secreción de gonadotropinas (Mylonas y

Zohar, 2001). Sin embargo, la función de la isoforma en el ciclo sexual es controversial. Las concentraciones de la cGnRH-II en el cerebro de peces, permanece constante durante el ciclo sexual en algunas especies como en *Sebastes rastrelliger* (Collins y col., 2001).

cGnRH-II tiene una alta expresión en el hipotálamo de primates (Latimer y col., 2000), en la especie *Macaca mulatta* la hormona participa en la secreción de LH y FSH (Lescheid y col., 1997; Urbanski y col., 1999).

La presencia de fibras y terminales de cGnRH-II cerca de neuronas motoras en el cordón espinal de elasmobranquios y anfibios indican que puede influir en el comportamiento reproductivo (Forlano y col., 2000).

Evolución de la función.

Trabajos en donde se aíslan isoformas de GnRH de las gónadas en varias especies de vertebrados, sugieren que la regulación parácrina de estos órganos fue una función primaria en el transcurso de la evolución y el papel neuroendocrino en la regulación en la hipófisis fue una función posterior en el transcurso del desarrollo evolutivo (Adams y col., 2003). Los péptidos de GnRH, originalmente pudieron haber estado implicados en la comunicación celular de la reproducción sexual de organismos unicelulares y multicelulares. Después, la GnRH fue reclutada por células nerviosas para la expresión de señales internas y externas en la activación de la reproducción, inicialmente por las células germinales y posteriormente vía activación de las células gonadotropas de la hipófisis. Adicionalmente, se presentó la utilización de GnRH, en la sensibilización del epitelio olfatorio a feromonas en peces cartilaginosos y en la activación de neuronas del sistema nervioso central (SNC) que afectan en el comportamiento sexual. Mientras el péptido ha sido utilizado como un regulador en varios niveles del sistema reproductivo: hipotálamo, gónadas, seno, útero y placenta. La aparente plasticidad del péptido como regulador se observa en tejidos no reproductivos como la glándula adrenal, el sistema inmunológico, la retina y el páncreas (King y Millar, 1995).

Se postula que este sistema II o cGnRH-II fue el primero en desarrollarse durante la evolución de los vertebrados. Este sistema originalmente ejercía todas las funciones sensoriales, motoras y neuroendocrinas en vertebrados, pero durante el curso de la evolución, el número de neuronas en el cerebro medio supuestamente disminuyó y las funciones sensoriales y neuroendocrinas fueron remplazadas por los sistemas del nervio terminal y del cerebro anterior.

Localización de la GnRH.

El cerebro en embriones de vertebrados se desarrolla en cuatro grandes regiones, conocidas como: telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo y romboencéfalo. En el subsecuente desarrollo a la forma adulta, estas regiones se diferencian en un mayor número de componentes. El telencéfalo se diferencia en los bulbos y lóbulos olfatorios y el hemisferio cerebral. El diencefalo origina tres regiones: el epítalamo que se encuentra en situación dorsal, el tálamo que tiene una posición central y el hipotálamo se presenta ubicación ventral. La mayor parte del diencefalo se diferencia en tálamo. El mesencéfalo da origen al techo óptico o *Tegum* óptico y otras estructuras del cerebro medio. Por su parte, el romboencéfalo se diferencia en el cerebelo y la médula (Norris, 1997, Fig. 5).

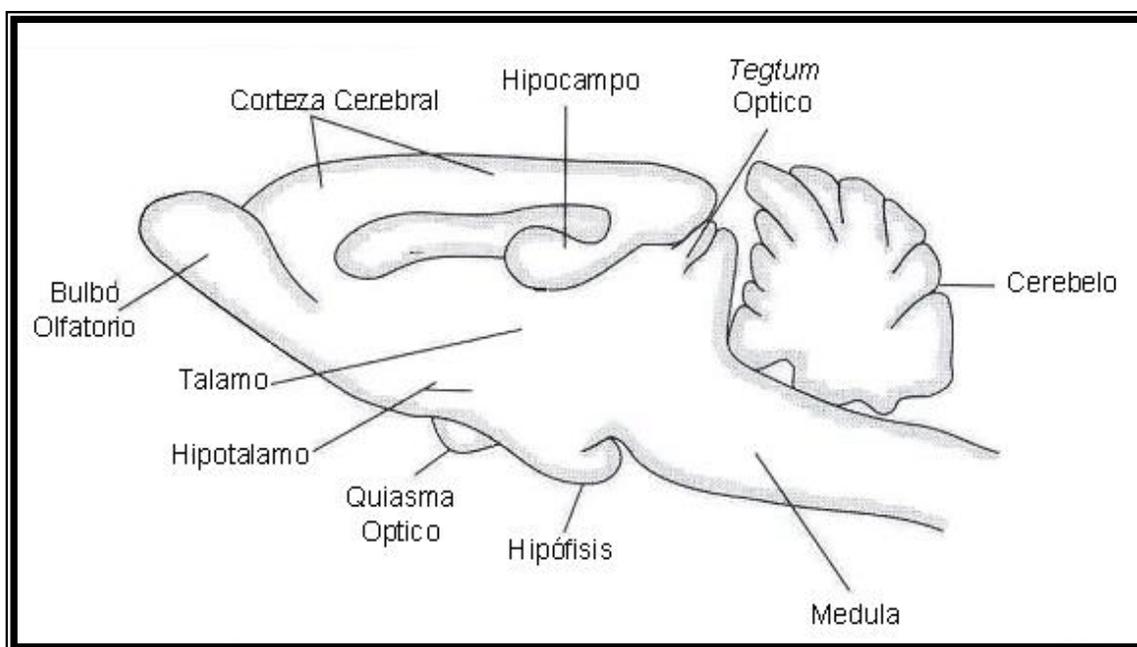


Fig. 5. Áreas en las que se divide el cerebro de vertebrados adultos (Modificado de Norris, 1997).

La distribución diferencial de las isoformas en el cerebro se demostró primeramente con la combinación de la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y el análisis de radioinmunoensayo (RIA), pero recientemente se ha utilizado la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica (Yu y col., 1997). Con la utilización de estas técnicas se ha observado que cGnRH-II se encuentra localizada en el *tegumentum* del cerebro medio de varias especies de vertebrados (Dubois, y col., 2002).

En teleósteos, cuerpos y fibras celulares dieron positivo a cGnRH-II, fueron encontradas en el *tegumentum* rostral del cerebro medio y en neuronas motoras del nervio oculomotor. Estos cuerpos celulares pueden pertenecer a el *nucleus medial longitudinal fasciculus*

(nMLF). Muchos de los cuerpos celulares fueron fusiformes, bipolares y largos (alrededor de 30 μm de diámetro) en las especies: *Haplochromis burtoni* (White y col., 1995), *Spaurus aurata* (Fig. 6a)(Gothilf y col., 1996), *Pagrus major* (Okuzawa y col., 1997), *Oreochromis mossambicus* (Parhar, 1997), *Orzias latipes* (Parhar y col., 1998a), *Oreochromis niloticus* (Parhar y col., 1998b), *Odontotesthes bonariensis* (Fig. 6b)(Stefano y col., 2000).

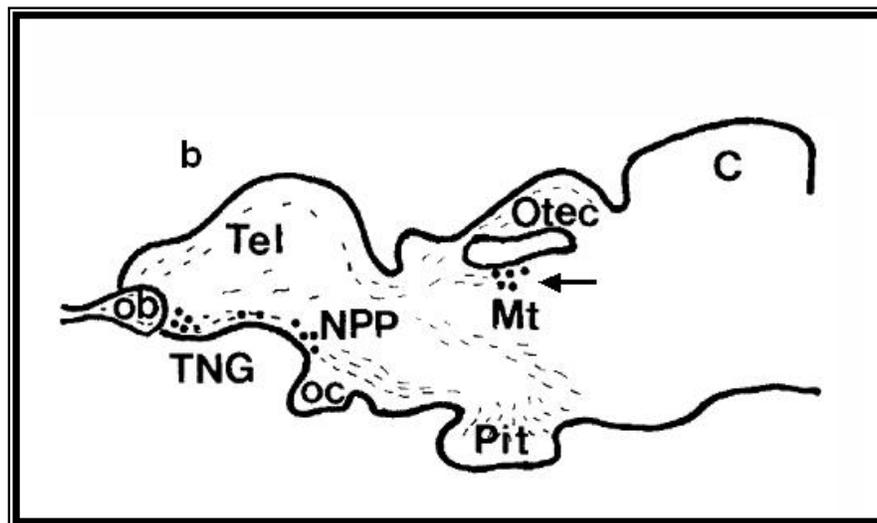
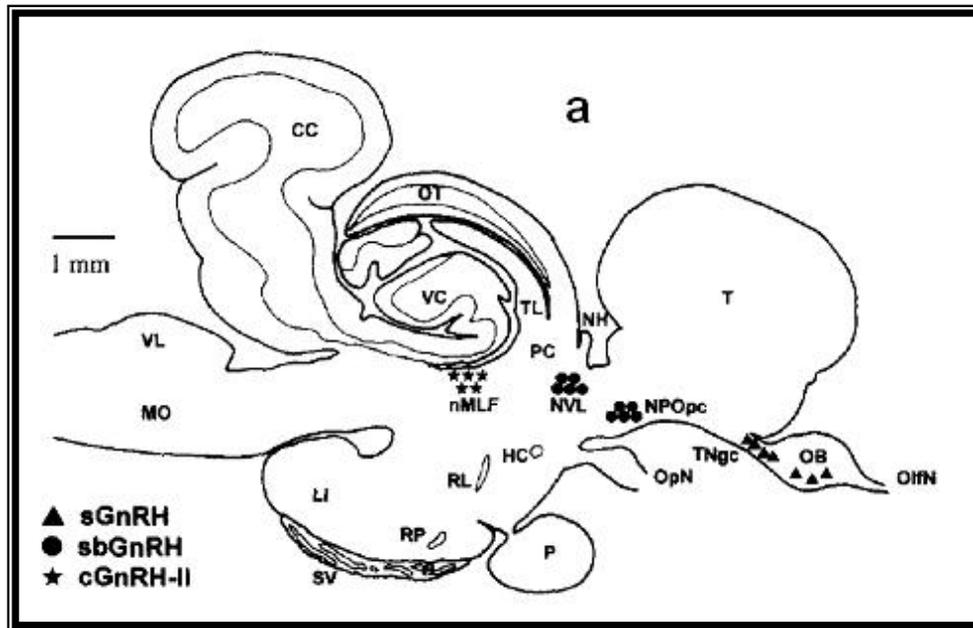


Fig. 6. Distribución de las isoformas de GnRH (cGnRH-II, flecha) en el cerebro de (a) *Spaurus aurata* (modificado de Gothilf y col., 1996) y (b) *Odontotesthes bonariensis* (modificado de Stefano y col., 2000).

En *Carassius auratus*, cuerpos celulares para cGnRH-II fueron observados en las siguientes áreas: en el *ganglio del nervio terminal*, en el *tracto olfatorio medio*, en el *telencefalo ventral*, en el *nucleus preopticus parvicellularis anterioris* y el *hipotalamus ventrolateral* y adición a estas áreas también fueron observadas en el *tegmentum rostral del cerebro medio* (Fig. 7). En esta especie la distribución de fibras para cGnRH-II fue básicamente similar a aquellas fibras de sGnRH. Además, el número de fibras de estas dos isoforma en la hipófisis no tienen diferencias significativas (Kim y col., 1995).

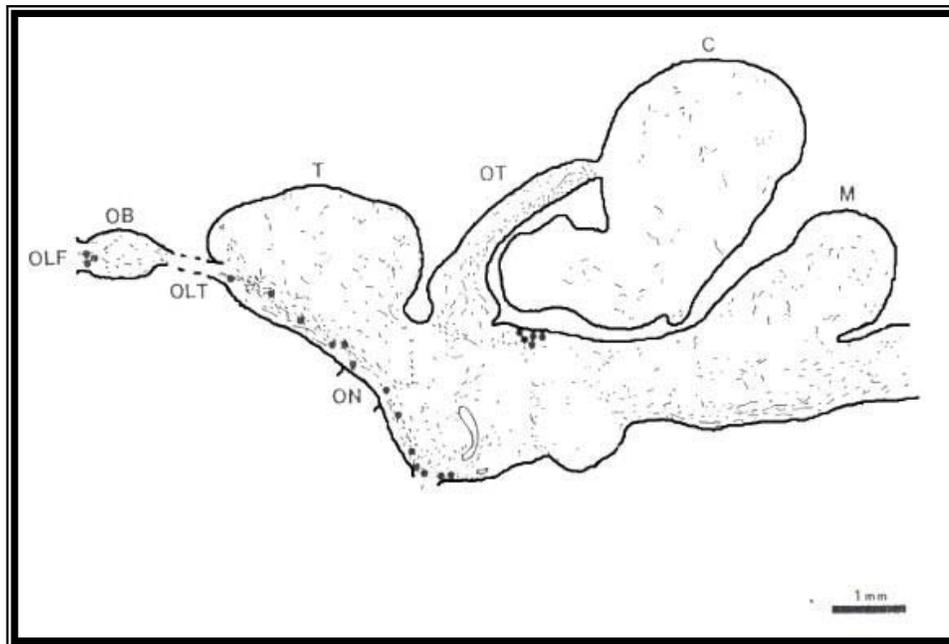


Fig. 7. Distribución de cuerpos celulares de cGnRH-II (puntos) y fibras inmunoreactivas para la isoforma (modificado de Kim, y col., 1995).

En la especie *Lates niloticus*, fibras inmunoreactivas para cGnRH-II (cGnRH-II ir) fueron encontradas en muchas regiones del cerebro (Fig. 8). Células que expresan cGnRH-II fueron detectadas en el tracto óptico, esta área contiene un gran población de cuerpos celulares. También fueron observados cuerpos celulares en el nervio óptico (ON) (Fig. 9). Muchas fibras fueron evidentes en el bulbo olfatorio las cuales corrían caudal y ventralmente, y llegaron hasta la superficie ventral del hipotálamo (Mousa y Mousa, 2002).

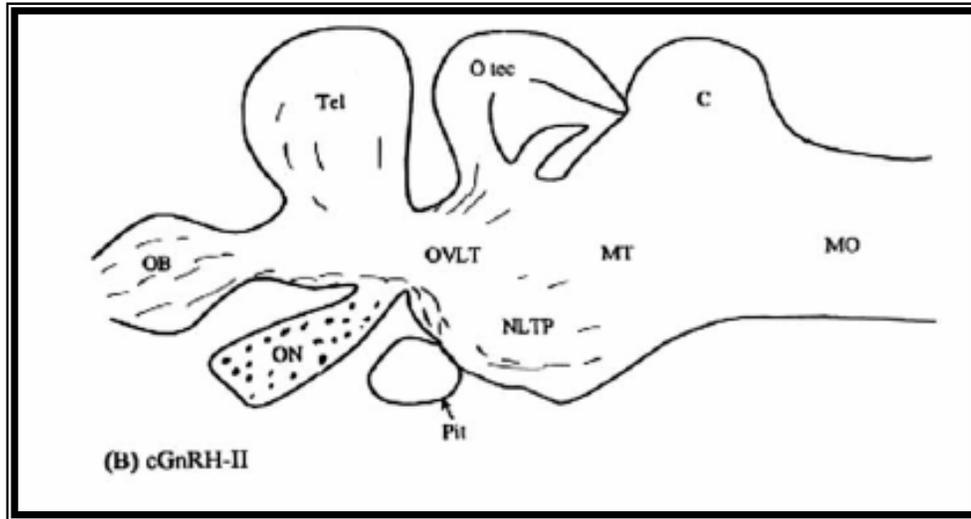


Fig. 8. Distribución de cGnRH-II en varias áreas del cerebro incluyendo el en tracto óptico (modificado de Mousa y Mousa, 2002).

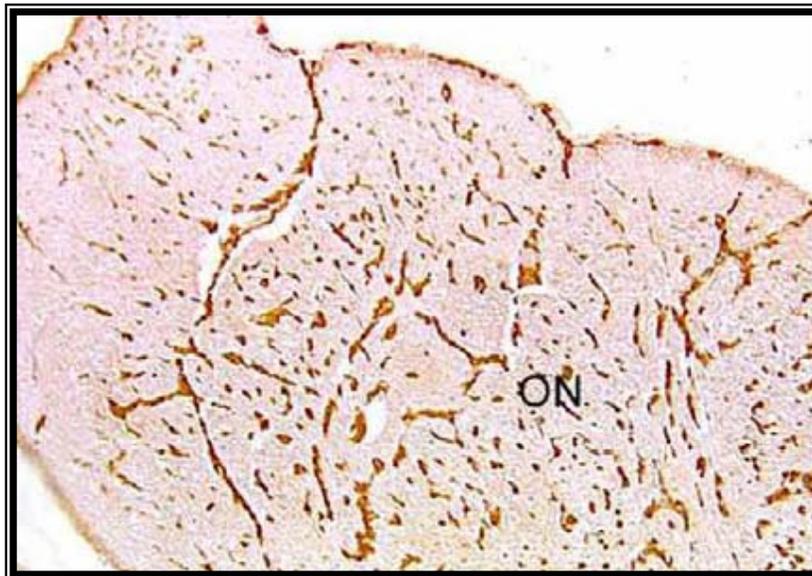


Fig. 9. Corte sagital a través del nervio óptico (ON), en donde se muestran células cGnRH-II-ir (modificado de Mousa y Mousa, 2002).

Capítulo 3. Biología molecular de la GnRH.

La estructura de las múltiples isoformas de GnRH se han obtenido mediante el análisis realizado a la secuencia del gen y del cDNA por métodos de biología molecular.

Estructura del gen.

El gen consiste de cuatro exones separados por tres intrones entre cada uno de ellos. El exon 1 contiene la región 5' sin traducir y se registra la presencia de cajas TATA y CAAT, las cuales son importantes en la transcripción del gen por la RNA polimerasa (Serwood y col., 1993). En el exon 2 se codifica para el péptido señal, el decapeptido, el sitio de procesamiento (Gly-Lys-Arg) y parte del GAP (específicamente para el GAP 1-9 en el gen de cGnRH-II). En el exon 3 se encuentran la parte media y final del GAP. En el exon 4 se encuentra la región 3' sin traducir (Fig. 10)(Fernald y White, 1999).

Un papel que se le ha atribuido al GAP es el de auxiliar en el plegamiento del péptido para facilitar posteriormente los sitios de ruptura, coadyuvando de esta manera a la maduración de la molécula (Cárdenas, 1997).

Algunos estudios sugieren que el GAP inhibe la secreción de prolactina y estimula la liberación de gonadotropinas, actualmente se considera que la función del GAP se limita a péptido de apoyo, y ha proporcionar la estructura secundaria adecuada para el procesamiento correcto del precursor de GnRH (Serwood y col., 1994). La longitud del GAP es de 49 aminoácidos en especies como el pez dorado.

Se desconocen cuales son los factores que regulan la expresión del gen para GnRH, aunque algunos experimentos señalan que las hormonas esteroides se encuentran entre los compuestos que pueden afectar la expresión de este (Okuzawa y col., 2003; Trudeau y col, 1992).

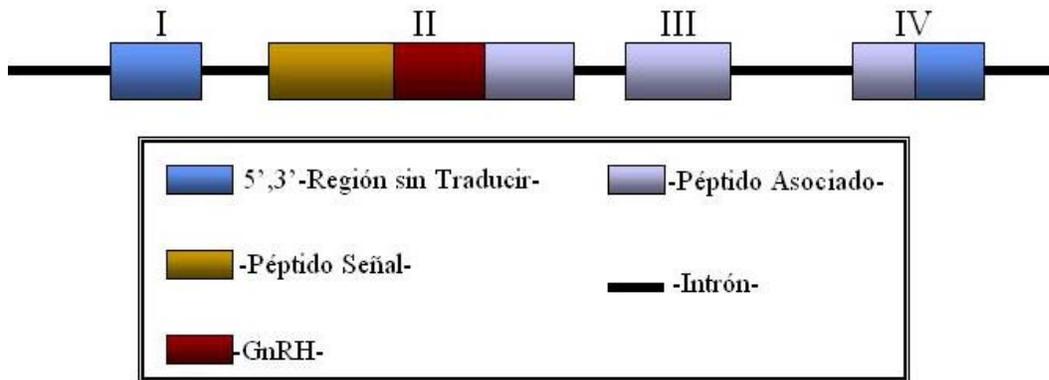


Fig. 10. Esquema de la estructura del gen (modificado de Fernald y White, 1999).

Evolución del gen.

Los genes para GnRH están presentes en todos los vertebrados y su origen evolutivo es antiguo, homólogos han sido encontrados en el pulpo y en un procordado (Hoffman, 2006). El gen aparentemente ha experimentado duplicación dando como resultado una proteína adicional en la región codificante la cual esta involucrada en la producción de una segunda forma del péptido. Aunque todos los vertebrados poseen múltiples formas de GnRH, es difícil determinar cuando exactamente esta duplicación se llevo a cabo. La similitud entre los genes de mamíferos y peces sugieren que derivan de un ancestro común, observándose que un cambio mínimo de solo 2 aminoácidos en la estructura son necesarios para convertir a mGnRH en sGnRH. Otra forma que deriva de la duplicación de su gen es cGnRH-II. Por otra parte en salmónidos que poseen tres tipos de isoformas la duplicación ocurrió a nivel de contenido cromosómico dando como resultado organismos tetraploides (Sherwood y col. 1993).

Estructura del DNA complementario (cDNA).

En vertebrados, los cDNAs conservan la misma estructura tripartita, los cuales contienen regiones 5' y 3' sin traducir y la secuencia codificante ó llamada también marco de lectura, la cual está formada por el péptido señal (SP), el decapeptido (GnRH) y el péptido asociado (GAP), el cual está conectado al decapeptido por un sitio de procesamiento (Gly-Lys-Arg). En peces teleosteos el cDNA para la isoforma cGnRH-II se ha aislado de *Clarias gariepinus* (Bogerd y col., 1994), *Sparus aurata* (Gothilf y col., 1996; No. de acceso en el Gene Bank U30325.1), en *Carassius auratus* se han aislado dos cDNAs (cDNA 1, Lin y Peter, 1996; No. de acceso en el Gene Bank U30386.1; cDNA 2, Lin y Peter, 1997; No. de acceso en el Gene Bank U40567.1, ver anexo), *Rutilus rutilus* (Pelington y col., 1997), *Oryzias latipes* (Okubo y col., 2000; No. de acceso en el Gene Bank AB041330.1, ver anexo), *Scleropages jardini* (Okubo y Aida, 2001; No. de acceso en el Gene Bank AB047326.1), *Verasper moseri* (Amano y col., 2002), *Danio rerio* (Steven y col., 2003; No. de acceso en el Gene Bank NM_181439.3, ver anexo), *Cyprinus carpio* (No. de acceso en el Gene Bank AY189961.1, ver anexo), *Monopterus albus* (No. de acceso en el Gene Bank AY786183.1, ver anexo), *Anguilla japonica* (No. de acceso en el Gene Bank AB026990.1, ver anexo), *Oncorhynchus mykiss* (No. de acceso en el Gene Bank F125973.1, ver anexo) y en *Coregonus clupeaformis* (Vickers y col., 2004).

En *Carassius auratus* el cDNA 1 tiene un tamaño de 682-bp, la región 5' sin traducir de 146-bp, la región codificante 258-bp y la región 3' sin traducir de 275-bp incluyendo una señal de poliadenilación y una cola poli A, también tiene un codón de paro (TGA) (Lin y Peter, 1996). Por otra parte el cDNA 2 tiene una longitud de 631-bp, la región 5' sin traducir de 118-bp, la región codificante 258-bp y la región 3' sin traducir 252-bp. Existe una similitud del 79.7% en las secuencias de nucleótidos entre los dos cDNA, entre las regiones 5' sin traducir tiene una similitud del 65.3%, del 91.2% entre las regiones codificantes y del 76.3% entre las regiones 3' sin traducir (Fig. 11)(Lin y Peter, 1997).

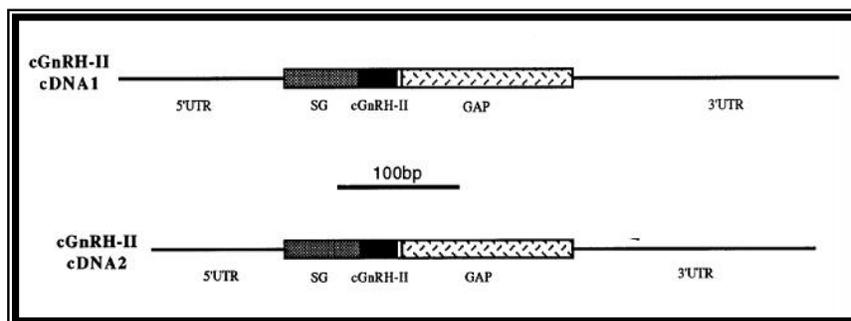


Fig. 11. Estructura de los cDNAs de *Carassius auratus* (modificado de Lin y Peter, 1997).

Rutilus rutilus tiene un cDNA de 658-bp de longitud con una región codificante de 255-bp y un sitio de translación en la posición -72 a -70. El péptido señal, el cual incluye una porción alta de amino ácidos hidrofobicos que van de la posición -79 a la -1, la región codificante va de la posición 1-30 y la región Gly-Lys-Arg van de la posición 30-39. El péptido asociado va de 40-186 y la señal de poliadenilación (AATAAA) es encontrada en la posición 366-371. La secuencia en esta especie tiene un 79.9% de similitud con *Carassius auratus* (Pelington y col., 1997).

En la especie *Verasper monseri*, la longitud es de 680-bp incluyendo la cola poli-A. La región 3' sin traducir va de la posición 95-433 y la región 5' sin traducir de -158 a -223, la región codificante de la 1 a la 255. El péptido señal esta compuesto de 23 aminoácidos y el GAP de 49 aa (Amano y col., 2002).

En *Danio rerio*, el tamaño del cDNA es de 659-bp y presenta un 77% de similitud con el cDNA 1 de *Carassius auratus*. La región 5' y 3' sin traducir existe una similitud del 65% y 68% respectivamente entre estas dos especies. Por otra parte, hay una similitud del 82% con respecto al segundo cDNA 2 de pez dorado y un 77% con *Rutilus rutilus* (Steven y col., 2003).

Capítulo 4. Receptor para GnRH.

Los eventos que llevan a cabo la síntesis y secreción de gonadotropinas por parte de la hipófisis son mediados por los receptores para la GnRH conocidos como "GnRHR". El conocimiento de su estructura, la interacción y su relación con las diferentes isoformas de GnRH así como con los análogos son esenciales para el entendimiento de muchos eventos como la fisiología del proceso reproductivo. En pocos años se ha demostrado que paralelo a la expresión de múltiples ligandos también se expresan múltiples receptores (Guilgur y col., 2006; Ikemoto y Park, 2005). Los cuales los podemos clasificar en 3 tipos llamados como tipo I, tipo II y tipo III. Entre los tres tipos, los GnRHRs en peces pertenecen al tipo I y tipo III (Millar, 2004). En mamíferos, el tipo I y el tipo II tienen selectividad a distintos ligandos. El tipo I es altamente sensible a la mGnRH, mientras el receptor tipo II muestra una clara preferencia por la cGnRH-II. Todos los tipos de receptores en teleósteos tienen una preferencia a la isoforma de pollo, seguido por la isoforma de salmón y después la tercera isoforma si es que existe (Ando y Urano, 2005).

Distribución de los Receptores.

La distribución de los receptores para la GnRH en el sistema nervioso central y glándula hipofisiaria es evidente en todos los organismos. En algunos casos particulares como en *Clarias gariepinus* y *Rana catesbeiana*, dos tipos de receptores han sido encontrados. (Guilgur y col., 2006; Morgan y Millar, 2004). En *Oreochromis niloticus* se han encontrado tres tipos (Soga y col., 2005)

Un aspecto de importancia ha sido, el determinar la expresión de los receptores en los diferentes tipos celulares de la hipófisis, en donde claramente se observa que las células gonadotropas no son el blanco exclusivo de las GnRHs. En *Astatotilapia burtoni* (Chen y Fernald, 2006) y en *Oreochromis niloticus* receptores son coexpresados, con frecuencia en células lactotropas, somatotropas, tirotropas, melanotropas, corticotropas y somatolactinas (Parhar y col., 2005). Los receptores en *Carassius auratus* son altamente expresados en las células gonadotropas a diferencia de las somatotropas en donde se expresan en menor cantidad (Illing y col., 1999).

En muchos vertebrados se ha observado la expresión de receptores en las gónadas: como en humanos, ratones y peces teleósteos (Fujii y col., 2004; Ikemoto y Park, 2005). En *Clarias gariepinus*, solo uno de los receptores muestra expresión en las gónadas, particularmente en el ovario presentando diferencias a lo largo del ciclo reproductivo de la especie (Boger y col., 2002).

La presencia de receptores en las gónadas también ha sido confirmada por estudios de unión, sugiriendo un efecto directo de GnRH sobre la producción de esteroides sexuales y en la gametogénesis (Pati y Habibi, 1993).

La expresión de GnRHRs en tejido no relacionado al eje reproductivo es de especial interés en particular en aquello relacionado a la osmoregulación y la visión. En *Dicentrarchus labrax* por ejemplo el receptor tipo I es expresado en las agallas y en el riñón (Moncaut, y col., 2005). En *Astatotilapia burtoni* se observa la expresión de los receptores tipo I y II en la retina (Grens y col., 2005)

Estructura del receptor.

Los receptores para GnRH pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G (GPCRs). Los miembros de GPCRs muestran en general tres dominios funcionales que incluyen: un dominio extracelular N-terminal (30-40 aa), un gran dominio transmembranal (280-290 aa) y un corto dominio citoplasmático C-terminal (30-50 aa). El dominio NH₂-terminal es seguido por 7 dominios transmembranales α -helice (TM), que son necesarios para anclar al receptor en la membrana celular, estos dominios están interconectados por tres asas extracelulares (EL) y tres asas intracelulares (IL). El receptor en peces muestra un residuo Asp en el segundo dominio transmembranal, que en mamíferos es convertido por un residuo Asn. Los dominios extracelulares y la región superficial de los TMs están usualmente implicadas en la unión del ligando, en este caso en particular a la GnRH. Los TMs también participan en el cambio conformacional asociado con la transducción de la señal (activación del receptor), mientras que los dominios intracelulares están involucrados tanto con la transducción como con la regulación del receptor. La parte final de la molécula, la región carboxilo terminal localizada en el citoplasma y es poco conservado, contiene sitios de glicosilación que son requeridos para la expresión del receptor (Lethimioner y col., 2004; Levavi-Sivan y Avitan, 2005; Mc Ardle y col., 2002) (Fig 12).

En 1992 el primer GnRHR fue clonado de una línea celular de gonadotropas, las células α T3-1 y desde entonces las secuencias de cDNA de otras especies de vertebrados y no vertebrados han sido clonados y caracterizados (Reinhart y col, 1992).

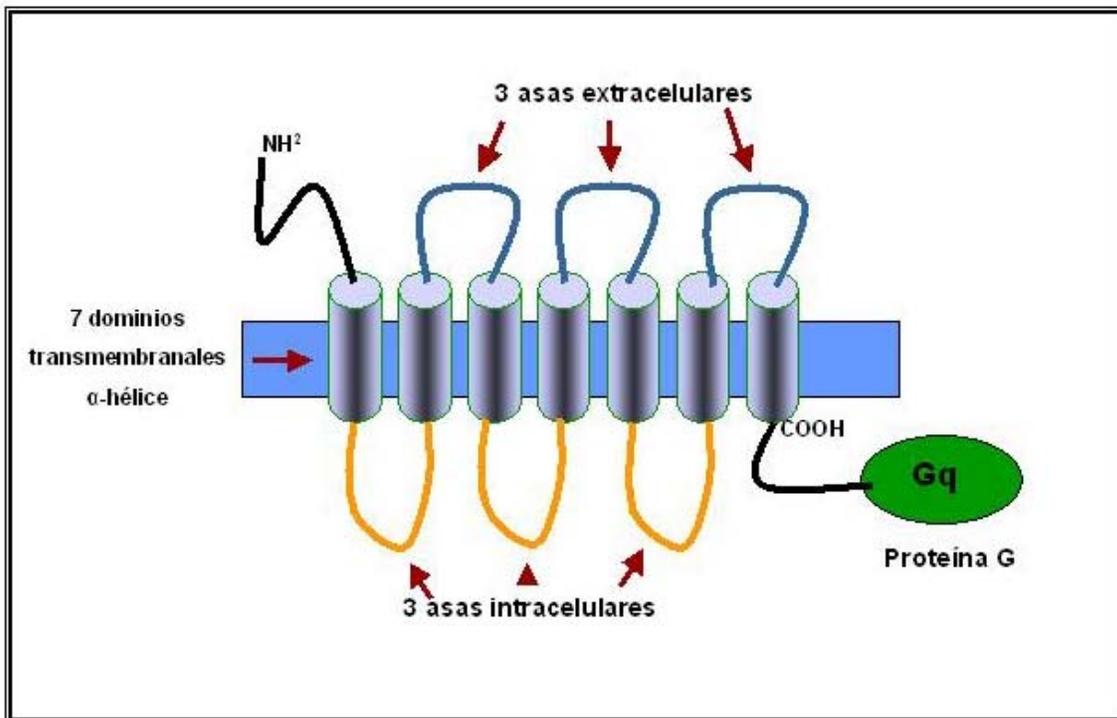


Fig. 12. Estructura del receptor para GnRH (modificado de Millar y col., 2004).

Diferencias entre el receptor tipo I y el tipo II.

La diferencia más notoria entre los receptores tipo I y tipo II es la conservación de una cola de 56 residuos en el receptor tipo II ya que en el receptor tipo I esta se encuentra completamente ausente. La secuencia de la cola no es conservada entre los mamíferos y los anfibios. Sin embargo el dominio de la cola se codifica en el exón 3, una forma ancestral del gen para el receptor tipo I fue interrumpida antes de un evento de eliminación que llevo a la subsecuente pérdida del dominio de la cola. Otra importante diferencia entre estos tipo de receptores ocurre en los dominios extracelulares, transmembranales y en las asas citoplasmáticas. También se observa una diferencia con respecto de la distribución de las carga eléctrica, observado en sus respectivos dominios extracelulares. En el receptor tipo II, el dominio N-terminal es 2 residuos más largo y la carga es más negativa que en el receptor tipo I. La asa extracelular 1 (EL-1) exhibe propiedades de carga similar en los dos tipo de receptores, pero la EL-2 está cargada más positivamente en el receptor tipo II. La EL-3 está cargada menos negativamente en el receptor tipo II en comparación con el receptor tipo I. Además, EL-2 y EL-3 son más cortos en el receptor tipo II que en el tipo I. (Pawson, 2003).

Relación Filogenética de los Receptores.

Analizando el dominio extracelular 3 (EL3) se propone que todos los receptores en vertebrados podían ser agrupados en 2 tipos generales: el tipo I de los cuales tiene el subtipo IA y IB, agrupando a los receptores para GnRH de la hipófisis de mamíferos incluyendo a los receptores de tetrápodos y de teleósteos. Los tipo II solo incluye a los receptores de tetrápodos (Troskie, 1998). Sin embargo, con el descubrimiento de receptores en varias especies, las relaciones filogenéticas han sido re-evaluadas sugiriendo que todos los grupos de receptores se encuentran en tres tipos generales (I, II y III). Esta propuesta fue basada sobre varios criterios por ejemplo: organización del gen, existencia de una cola C-terminal y la relación del árbol clado-filogenético de los ligandos, considerando que el modelo del árbol carece de una filogenia clara, el soporte estructural-función, se han propuesto dos tipos de modelos, los cuales incluyen al receptor de mamíferos tipo I y II. Dentro de cada tipo, eventos específicos de duplicación (en algunos casos mas de uno) ocurrieron en la evolución temprana de diferentes taxas como en anfibios y en peces (Millar, 2004).

El análisis de la estructura primaria muestran que las diferencias en el tamaño de la cola C-terminal la cual es una de las características generales de este tipo de receptores. El receptor tipo I de todos los vertebrados tienen una cola pequeña de entre 36 y 56 aminoácidos, con el caso extremo del receptor tipo I de mamíferos que completamente perdió la parte de la cola. En contraste el receptor tipo II tiene una cola terminal de 54 a 79 aminoácidos de longitud, de esta forma, desde un punto de vista evolutivo, la pérdida de esta región es una tendencia, con implicación en el mecanismo de traducción. La presencia de la cola C-terminal en el receptor de *C. intestinalis* es un indicativo que el receptor ancestral tenía una cola C-terminal y que su ausencia en mamíferos es solo una característica derivada (Guilgur y col., 2006).

Vías de transducción.

Al momento de la unión del péptido (GnRH) con el receptor (GnRHR), se activan dos vías de transducción para cada proceso de secreción ya sea para las GtHs y la GH, las cuales tienen requerimientos diferentes (Ruf y Sealfon, 2004). En el pez dorado, la sGnRH y la cGnRH-II actúan como neurohormonas hipofisiotropicas, uniéndose a la misma clase de receptores y activando las diferentes vías de transducción (Chang y col., 2000).

La vía de transducción clásica utilizada por el GnRHR en las células gonadotropas para la estimulación de las gonadotropinas (GtHs) es mediada por la vía de segundos mensajeros. Cuando las células son expuestas a GnRH, esta estabiliza un cambio conformacional en el receptor que promueve la activación de las proteínas G heterotrimericas ($G_{q/11}$, G_s , $G_{i/o}$) (Gavi y col., 2006). La principal proteína G que es activada por la hormona es una de la subclase $G_{q/11}$. La fosfolipasa $C\beta$ ($PKC\beta$) es activada por la proteína $G_{q/11}$ y produce dos segundos mensajeros, el inositol 1,4,5-trifosfato [$Ins(1,4,5)P_3$] y el diacilglicerol (DAG). El inositol 1,4,5-trifosfato [$Ins(1,4,5)P_3$] se cataliza de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5-bifosfato. El $Ins(1,4,5)P_3$ induce la liberación de calcio [Ca^{2+}]_i de depósitos intracelulares (presumiblemente provenientes del retículo endoplásmico), mientras el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC). Esta, a su vez permite que canales de calcio sensibles a voltaje (VSCC) se abran promoviendo la entrada de calcio extracelular [Ca^{2+}]_e. El incremento de calcio intracelular estimula la liberación de GtHs (Ishizaki y col., 2004). En este sistema, cGnRH-II es capaz de aumentar las concentraciones de calcio intracelular [Ca^{2+}]_i. Para ello, parece activar los canales de calcio sensibles a voltaje (VSCC) de tipo L. Este canal puede estar relacionado con alguna proteína G de la membrana. Otra posible vía por la cual parece favorecerse la secreción de gonadotropinas (GtHs), es a través del aumento en los niveles de ácido araquidónico (AA) mediado por la fosfolipasa A2 (PLA2) (Chang y col., 1996; Chang y col., 2000; Dobkin-Bekman y col., 2006; Klausen y col., 2001; Ruf y Sealfon, 2004) (Fig. 13).

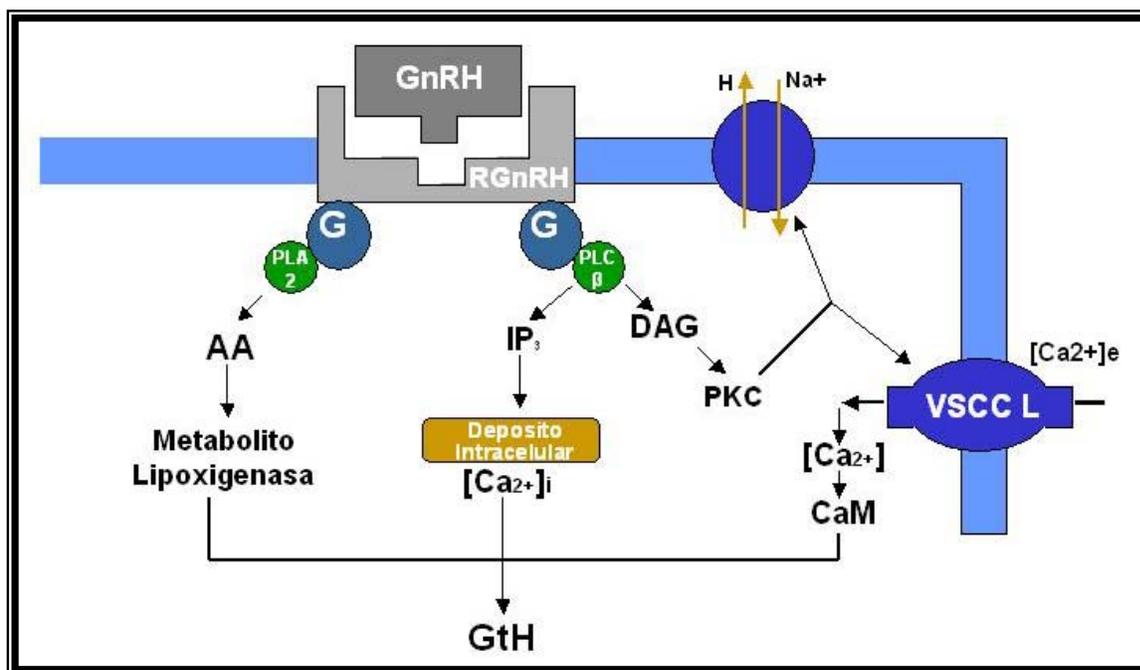


Fig. 13. Representación de la vía de traducción para las gonadotropinas (modificado de Chang y col., 1996; Chang y col., 2000)

Por otra parte para la secreción de la hormona de crecimiento (GH). GnRH activa una vía similar a la utilizada para la liberación de las GtHs. Con la activación de la proteína cinasa C (PKC) que estimula la entrada de calcio extracelular $[Ca^{2+}]_e$ a través de canales de calcio sensibles a voltaje (VSCC). El incremento de calcio intracelular interactúa posiblemente con la PKC para incrementar la secreción de GH. La CaM cinasa II está también involucrada en la etapa de proteína cinasa C (PKC). La proteína cinasa C (PKC), los canales de calcio sensibles a voltaje (VSCC), el calcio extracelular $[Ca^{2+}]_e$ y calmodulina (CaM) están involucrados para la estimulación de la hormona de crecimiento (GH). A pesar del papel de los canales de sodio (Na^+) estos no han sido caracterizados en las células somatotropas del pez dorado, resultados preliminares sugieren que Na^+/H^+ también participan en la secreción de la hormona de crecimiento (GH). (Chang y col, 1996; Chang y col., 2000; Klausen y col., 2001) (Fig. 14).

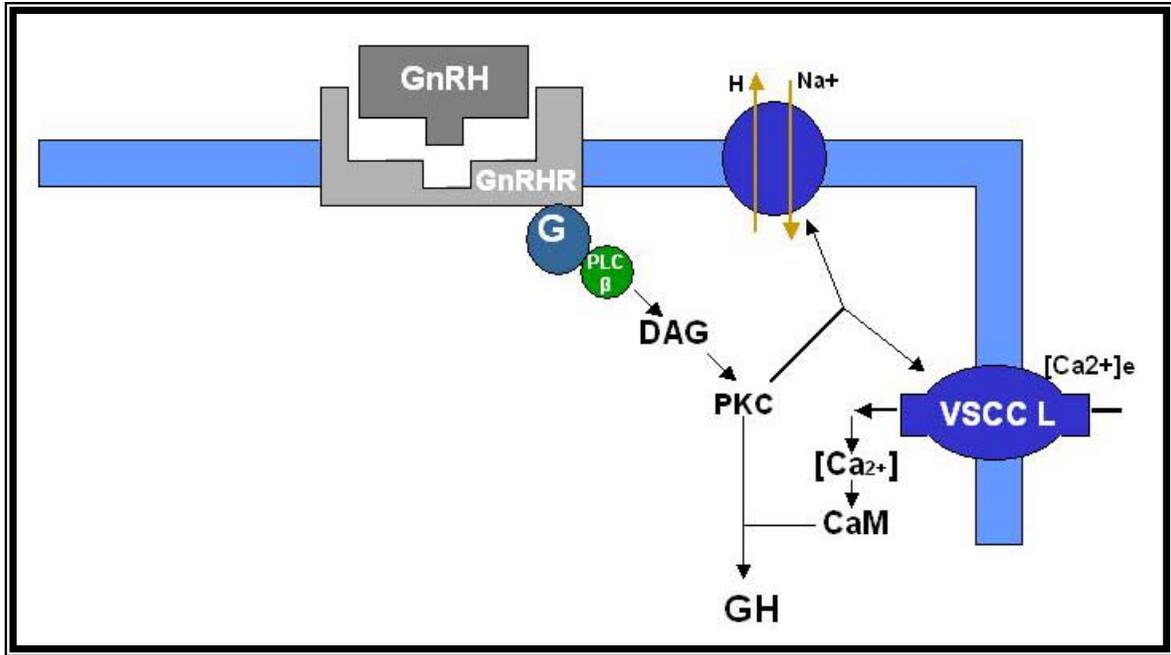


Fig. 14. Representación de la vía de traducción para la hormona de crecimiento (modificado de Chang y col., 1996; Chang y col., 2000)

Discusión.

Desde su descubrimiento la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) ha sido una hormona que generó una gran expectativa por su papel como hormona clave en el control de las funciones reproductivas y su potencial de aprovechamiento (Limonta y col., 2003). La biología de la hormona ha abierto diversos campos de investigación y en los últimos 15 años la generación y cúmulo de conocimientos se ha incrementado de manera exponencial, especialmente en temas referentes a la estructura genética, la regulación de la transcripción, las distintas isoformas y variantes, la distribución en áreas fuera y dentro del encéfalo en diversas etapas del desarrollo de los vertebrados, las diversas funciones con las que es vinculada, así como su presencia en diversos organismos invertebrados y vertebrados y más recientemente en diversos aspectos de la biología molecular de la hormona.

Por este nuevo bagaje de conocimientos se han hecho revisiones en las cuales se reportan nuevos enfoques acerca del origen, evolución, distribución, regulación y funciones de las variantes de las GnRHs. Los cuales se tomaron en consideración para la elaboración del presente trabajo el cual es una revisión de la variante de pollo (cGnRH-II) o sistema 2 (GnRH 2), sin embargo, para entender aspectos de este sistema se tuvo que mencionar a las otras isoformas y sistemas ya que dichos grupos conservan una relación entre sí.

Primeramente, la GnRH forma parte de una familia de isoformas que a la fecha suman 24 miembros y se han aislado de organismos vertebrados e invertebrados siendo el grupo de los peces en el que se han obtenido más isoformas (Gorbman y Sower, 2003; Lethimonier y col., 2004, Tsai, 2005; Guilgur y col., 2006). Estas conservan la misma estructura decapeptídica básica siendo los extremos los sitios más conservados (Gorbman y Sower, 2003), las diferencias se encuentran a nivel de la cadena de aminoácidos y pueden ser de una a cinco posiciones diferentes. Tomando a la isoforma de mamífero como base la cGnRH-II cambia un Tyr por un His en la posición 5, en la posición 7 se cambia una Leu por un Trp y en la 8 cambia un Arg por un Tyr, con estos cambios una forma de nombrar a la isoforma de pollo puede ser [His5,Trp7,Tyr8]-GnRH.

Otra propuesta para nombrar a las isoformas que ha ido cobrando fuerza entre los estudiosos de este decapeptido, es de acuerdo a su localización y función en el encéfalo, este criterio las renombra de la siguiente manera en sistema de la GnRH 1, sistema de la GnRH 2 y sistema de la GnRH 3 (Dubois y col., 2002). Se ha observado que en los

organismos tetrápodos se expresan de dos a tres sistemas en áreas del sistema nervioso central. La GnRH 1 es a la que se le ha dado la función hipofisiotropica encargada de la secreción de las gonadotropinas y se encuentra localizada en el cerebro anterior. En este grupo encontramos principalmente a las isoformas, sGnRH, mGnRH, wfGnRH, mdGnRH, hgGnRH, cfGnRH y sbGnRH en peces, anfibios, reptiles, mamíferos y humanos (Yamamoto, 2003). El sistema GnRH 2 es expresado en el cerebro medio jugando el papel de neurotransmisor y/o neuromodulador. También es el mas conservado encontrándolo en todos los vertebrados a excepción de los peces agnatos, se postula que este sistema fue el primero en desarrollarse durante la evolución de los vertebrados y ejercía todas las funciones sensoriales, motoras y neuroendocrinas en los organismos, pero durante el transcurso de la evolución este fue remplazado por los sistemas del nervio terminal (GnRH 3) y del cerebro anterior (GnRH 1) (Ogawa y col., 2004). El último de los sistemas corresponde al GnRH 3, este se localiza en el nervio terminal y hasta la fecha en peces se tienen descritas hrGnRH, wfGnRH, pgGnRH y sbGnRH (Somoza y col., 2002). Sin embargo, este sistema ha sido descrito recientemente y comienza a investigarse por lo que deberán transcurrir algunos años para que se sigan acumulando evidencias en las diversas especies y pueda constatar si existe o no las mismas funciones o la existencia de otras isoformas de acuerdo a la especie en cuestión.

En términos evolutivos, de los tres sistemas manejados el primer y tercer sistema presentan variaciones con la presencia de distintas isoformas actuantes. Sugiriendo que el sistema 2 no han podido ser remplazados por otra variante de una mejor manera. La conservación de la estructura molecular tanto a nivel de su secuencia genética como la del péptido ha hecho suponer que la hormona ha recibido una fuerte presión selectiva para poder mantenerse con pocas variaciones que alteren de manera fundamental su estructura. Analizando la estructura del gen de todas las isoformas se reafirma la idea de la alta presión selectiva ya que el numero tanto de intrones y exones es igual. También la estructura de la preprohormona guarda mucha similitud. Sin embargo la secuencia ha sufrido mayores cambios es el GAP. En teleósteos en la cGnRH-II su GAP tiene una longitud de 49 aminoácidos, las isoformas sGnRH y sbGnRH sus GAPs tienen una longitud mas larga ya que son 58 y 64 aa. respectivamente y el de la cfGnRH es más chico midiendo 46 aa (Kuo y col., 2005; Yu y col., y col, 1997). Estas variaciones en el tamaño no afectan la función primaria de la molécula haciendo pensar que esta región puede ser la menos importante.

Para las distintas isoformas, quizás lo que menos ha variado son los mecanismos de transcripción. En las cuales se tiene que los tipos de receptores se han conservado a través de la evolución con sus ligandos a pesar de las variaciones de la hormona. Como ya se mencionó en el presente trabajo los receptores se pueden dividir en tres tipos tipo I, II y III, siendo el tipo II afin a la cGnRH-II. Entre el receptor tipo I y II existen diferencias a nivel estructural. En el tipo II tiene una cola de 56 residuos de longitud, está se encuentra ausente en el tipo I. También se observa una diferencia con respecto a la distribución de las cargas eléctricas, el tipo II en su dominio N-terminal es 2 residuos mas largo y la carga se vuelve mas negativa que en el tipo I (Pawson, 2003).

El receptor al momento de unirse con el péptido activa la vía de transcripción para la secreción y liberación de gonadotropinas en la células gonadotropas de la hipófisis. En estudios *in vivo* e *in vitro*, se ha observado que la cGnRH-II puede estimular la activación de esta vía a pesar de que esta no es la isoforma hipofisiotropica. También puede activar la vía de transcripción para la secreción de la hormona de crecimiento en las células somatotropas de la hipófisis. Tanto en las células gonadotropas como en las somatotropas el receptor se encuentra acoplado a proteínas de tipo G que activan una cascada de segundos mensajeros siendo similares en ambas vías la diferencia radica que en la secreción de las GtHs se activa el metabolito de la lipoxigenasa.

CONCLUSIONES.

- La importancia de GnRH en el proceso reproductivo es reflejado por la existencia de una gran cantidad de información en diferentes campos de estudio.
- La variante de pollo o cGnRH-II conserva la misma estructura primaria desde peces hasta mamíferos incluyendo al humano.
- La localización de cGnRH-II en el *tegmentum* del cerebro medio indica que tiene una función neuromoduladora, sin embargo en estudio *in vitro* e *in vivo* indican un papel estimulatorio en la secreción y liberación de las hormonas gonadotropinas y la hormona de crecimiento.
- El receptor II tiene una alta afinidad para cGnRH-II siendo este su receptor afín. Las características de este receptor son las mismas que los receptores acoplados a las proteínas G.

ABREVIATURAS.

- A** Adenina.
aa Aminoácido.
ALA Alanina.
ARG Arginina.
ASN Asparagina.
ASP Ácido Aspártico.
CYS Cisteína.
PHE Fenilalanina.
GLY Glicina.
GLU Ácido Glutámico.
GLN Glutamina.
HIS Histidina.
ILE Isoleucina.
LEU Leucina.
LYS Lisina.
MET Metionina.
PRO Prolina.
SER Serina.
TYR Tirosina.
THR Treonina.
TRP Triptófano.
VAL Valina.
AA Ácido araquidónico.
bp Par de bases.
C Cerebellum (Fig. 6b; 7).
C Citosina.
[Ca²⁺]_e Calcio extracelular.
[Ca²⁺]_i Calcio intracelular.
CaM Calmodulina.
CC *Corpus cerebelli*
cDNA Ácido desoxiribonucleico complementario.
cGnRH-ir Fibras inmunoreactivas para cGnRH-II.
DAG Diacilglicerol.
DNA Ácido desoxiribonucleico.
EL Asa extracelular.
G Guanina.
GAP Péptido asociado a la GnRH.
GH Hormona de crecimiento.
Gly-NH₂ Glicina amidada en el extremo carboxilo terminal.
GnRH Hormona liberadora de gonadotropinas.
cGnRH-I Isoforma de pollo I.
cGnRH-II Isoforma de pollo II
cfGnRH Isoforma de pez gato.
dfGnRH Isoforma de condriictios.
gpGnRH Isoforma de cobayo.
hrGnRH Isoforma de arenque.
IGnRH-I Isoforma de lamprea I.
IGnRH-III Isoforma de lamprea III.
mGnRH Isoforma de mamífero.
mdGnRH Isoforma de medaka.

oGnRH Isoforma de pulpo.
rGnRH Isoforma de rana.
sGnRH Isoforma de salmón.
sbGnRH Isoforma de dorada.
tGnRH-I Isoforma de tunicado I.
tGnRH-II Isoforma de tunicado II.
tGnRH-III Isoforma de tunicado III.
tGnRH-IV Isoforma de tunicado IV.
tGnRH-V Isoforma de tunicado V.
tGnRH-VI Isoforma de tunicado VI.
tGnRH-VII Isoforma de tunicado VII.
tGnRH-VIII Isoforma de tunicado VIII.
tGnRH-IX Isoforma de tunicado IX.
wfGnRH Isoforma de pez blanco.
GnRH1 Nombre de la isoforma localizada en el área hipotalámica.
GnRH2 Nombre de la isoforma localizada en el área mesencefálica.
GnRH3 Nombre de la isoforma localizada nervio terminal.
GnRH-R Receptor para la hormona liberadora de gonadotropinas.
GPCR Receptores acoplados a proteínas G.
GtH Hormona gonadotropina.
HC Horizontal commissure.
HHG Eje hipotálamo hipófisis gónada.
[His⁵,Trp⁷,Tyr⁸]-GnRH Isoforma de pollo nombrada de acuerdo a la alteración y la posición en la cadena de aminoácidos.
HPLC Cromatografía líquida de alta presión.
[Hyp]-GnRH Variante hidroxilada de la isoforma de mamífero.
IL Asa intracelular.
Ins(1,4,5)P3 Inositol1,4,5-trifosfato.
LH Hormona luteinizante.
LHRH Hormona secretora de la hormona luteinizante.
LI lobus interior hypotalami.
M Medulla oblongata.
MO Medulla oblongata.
Mt Nucleus tenia.
MT Tegumentum del cerebro medio.
Na⁺ Iones sodio.
NH Nucleus habenularis.
NLTP Nucleus lateralis tuberis pars posterior.
nMLF Nucleus medial longitudinal faciculus.
NO Óxido nitroso.
NPP Nucleus preopticus periventricularis.
NPOpc Nucleus preopticus pars paevocellularis.
NVL Nucleus ventrolateralis thalami.
OB Bulbo olfatorio.
OC Quiasma óptico.
OLF Nervio olfatorio.
OLT Tracto olfatorio.
ON Nervio óptico.
OpN Optic nerve.
OT Optic tectum.
Otec Techo óptico.

OVLT Organum vasculosum laminae terminalis
P Hipofisis.
PC Posterior commissure.
pGlu Residuo piroglutámico en el extremo amino terminal.
Pit Hipofisis.
PKC Proteína cinasa C.
PKC β Fosfolipasa C β .
PLA2 Fosfolipasa A2.
RIA Análisis de radioinmunoensayos.
RL Recessus lateralis.
RNA Ácido ribonucleico.
RP Recessus posterioris.
RTK Receptor tirosincinasa.
SNC Sistema nervioso central.
SP Péptido señal.
SRIF ó **SS** Somatostatina.
SV Saccus vasculosus.
T Telencephalon (Fig. 6a).
T Timina.
Tel Telencéfalo.
TL Torus longitudinalis.
TNG Ganglio del nervio terminal.
TNgc Células del ganglio del nervio terminal.
TM Dominio transmembranal α -hélice.
VC Valvula cerebelli.
VL Vagal lobe.
VSCC Canales de calcio sensibles a voltaje tipo L

ANEXO.

Danio rerio NM_181439.3.

AGAGAATGAGTGGCAGAAGTATCTCAGAGGCTCTGTGATTTTACTCAACCGCCCACTT
CAGGAAAAAGAGAACATTTTCAGGATTACCAACACCAGGACTGCGGTAGAGGAGCTAC
AGCAGAAGATACCTCAAGAGGAGACGTGCCAAAATATTAGACTGAAGTGATGGTGCT
GGTCTGCAGGCTGCTGTTGGTTCGTGGGGCTGATGCTGTGTCTGAGTGCTCAGTTGA
GCAGCGCTCAGCACTGGTCTCACGGCTGGTATCCTGGAGGAAAAGAGAGATAGAC
CTCTACGACACCTCAGAGGTTTCAGAGGAAGTGAAGCTCTGCGAGGCAGGAAAATGC
AGTTACCTGAGACCGCAGGGAAGAAACATCCTCAAGACAATACTGCTGGATGCCCTC
ATTCGTGATTTCCAAAAGAGAAAGTGACACCAAGCTGATGCTTCAGCCTGTGTCCAAA
GAAACATCTTTTCCAGCAAGCACATTTGGCCTGCCTTTTCATTCCAAACTGTATATATT
GTGTTATTCCTGTGACTTTATTTCTTTCAATTTGTATGTGTATGTTTAGTTCTGTTCTCA
TATTCATTGTGAGTAAATCGACTGCCGGCACCGTGTACCCATTTGCAGCAGTTCCTAC
AATAAAGGCTTTATTTTGGTATTTTG

Cyprinus carpio AY189961.1

GGATTACCAAGACCAGGACTGCACAGTAGAGGAGAATATCCTTCAGGAAAAGACGGG
CCAAAAGATACAAGTTATGGTGCACATCTGCAGGCTGTTTGTGGTGATGGGGATGTT
GCTGTGTCTAAGTGCCCAAGTTTGCCAGCTCTCAGCACTGGTCTCATGGCTGGTACCC
TGGAGGAAAAAGAGAGATAGACGTTTACGATACCTCAGAGGTTTCAGAGGAAATTA
CTCTGTGAGGCAGGAAAATGCAGCTACCTGAGACCCCAGGGAAGAAACATTCTGAAG
ACAATACTGCTGGATGCCCTCATACGGGATTTCCAAAAGAGAAAGTGACACCAAGAG
ACGCAACAGCCTGTGTCCAAAGAAAAATCCTTTCCAGCAAACACATTAGGCCTGCATT
TCCATCCAAATTATACATATAATTATTTTGTATTCTGTGATTTGTTTTTGTAT
GTGTTGTATTTGTTCTTTTCTCATATCCACTGTGAGTGAACCTATACTGCCAGCACTAT
GTAACCATTTGCAGCAGTTCCTACAATAAAGGCTTTATTTTGCTAAAAAAAAAAAA

Monopterus albus AY786183.1

AGAGAATCTTTACAGTAAAACACCTGTGAAACCGTGAGATACCTTTAGAAGTGGTCTA
CTGAGGGAAAAGCAGAGTGGACTTCTGGAGAGACGTTAAGGGACACCAGTGCCAAA
AAAGTTGAGTTTAGACTAAGATTTCTAAAGCAGGTCAAACAGCAGGTGGAATATGA
TTCGGCTGGTCTTGCTGCTGGGGCTCCTTCTATGTGTGGGGGTTTCAGCTGTCCGGCC
CCCAGCACTGGTCCCATGGCTGGTATCCTGGTGGCAAGAGGGAGCTGGACTCTTTC
CCCACATCAGAGATTTTCAGGGGAGATTAATCTGTGTGAGGCAGGGGAATGCAGCTAC
CTGAGACCCCAGAGGAGGAGCATACTCAGAAGCATTCTTTTGAATGTATTAGCCAGA
GAGCTCCAGAAGAGGGAAGTGACAGCTTTCCACCCTACACTGCTTTTCTTCTAGTGAC
CCTCTTTATCATGGCATGAATCAACTTCATGCCGATCCTCTGATCTTGTGCATTTGTTT
AGTAAAAGTGTTCATGGTTTCTCTTTGTGGCGCAGAAATATTGAAGTTACAATATC
TCATAATAAAGTATCTATTTTGATACTAAAAAAAAAAAAAAAA

Anguilla japonica AB026990.1

GACTTTACTAGCCAAAGAATCTCAGAGCTCTGACATCCACACAGCGACTCTGAAATCT
GCTCAAAGTGAAGAAACGCTTTTCAGTGCCGACATAGGAGAACAGGAGACGTGGAGAC
AAAGCAGGAGCCAAAAAACAAGAACTGACAGAAGAACTGACAAAATTGGACAGACAG
GAGAGCTCTTCAAGGAACATCCAATTGATTTTATTGCATCCATCTTTAGCTGTGATGG
TGAACACCGGCAGGCTGGTGTGATTTTGGGGGTGCTGCTGTGTTTGGGGGCGCAG
CTCTCCCTGTGTGAGCACTGGTCCCACGGCTGGTACCCCGGGGAAAGAGGGAGCT
GGACTCCCTCAGCACCGCCGAGGTATTGGAAGAGATAAAGCTCTGCGATGGGGGAG
AATGCAGCTACTTGAGACCCCAGCGGAAAAGCCTCTTAAAAAACATTCTGCTGGACG
CCCTCGCCCGGGAGTTCCAGAGGAAGAGGAAGTGACATCACCCGGCTGTTCTTCTT

CACATAGCAACTGTATCCAGATGGACAAGTCAGTCTTCCCTGGAACGACTGGGACCA
AATGGATTGGCAACAGCCTTGCAGTTAAATCAGTCTCCTATGACTCGCTCTACCATTA
TTTACTGAAGCAACTTTAATTTCTCTTGTATTATGCTCCATTCTTCTCATGGTCTCATG
GTCTGTTTCCCTAATTTTATTTGCTCTTATATTCTGATTGCATTCCCTTATACATTCTCAGA
ATTGTCAGACTCTCTCTGTCTCTCTCTCTCTCTTTTCATATTGTCTTTCTGTGAAAACC
CTCCTTCAGCTGACACACACTGCAACTCTATATTACTGTAACATGTTGTCAATCCGTAT
TTAATAAAAGTATTTATTTGTTACATAC

Scleropages jardini AB047326.1

GTTAATCAGTAATACATTTTTTGTCTTAAACCAGTTAACTACAACATTCTTTCAGCTGAT
TTATTTTTAGTGCGATTGTGTTAAAATATTCACACTGATTCACTTAGTCTCAAGAAGCAT
TCGTCCTGTGCAGGGCTGGACTGGTCTGGAGCATATCTCAGAAGCACAGGGTGCTA
GGCTAGGCTGGGTACACTGCAGATAATATGCAAAATCATTGCAGCATAATCATCACTT
ATAATAAAACACAAAAGTACATAGTGAGCCATTAGAATTAATTTAGGAATTGCTGCC
TACTTTTAGTTCATATTTTGCCGGTACCTTCAACATACTGTAATGCTCTTAAATAATTTA
TACATCTCTTTTGTGGAATTTGCTTTCCATAAATTTACTTTATAATGTGATGTCCTTATT
TACTGATCACTACTCACTACCATATTTTTCAAAAACTCATCATTTTACAAGACACTTTT
CTTCCAATAACAGCTTGTCTTCTGAAGTTTTCTTCCCAGCTGTGGTGATGGTGTGTG
TAGGCAGGCTGACACTGCTTCTTGGGATACTTCTGTGCTCGGGGGCACAGCTCTCCT
GCTCCAGCACTGGTCCCATGGCTGGTACCCTGGTGGGAAGAGGGAGCTGAACTCG
CTTACTGCCTCCGAGGTTTCAGGGAAGATTAACTATGTGAGGACAGAAAATGCAGCT
ACCTGAGACCTCAGCAAAAAACATCTTAACCATTCTGGTGGATGCTTCGACAAGAGA
GTTTCGGGGAAAGAGGAAGTGACAGGACTGACCTGCTGTTTTGTTGTACATTCTTCT
CTCATTGCTTTAGTGGCCTCCATGGACAATTTTTACCCACTTTATGCTTCTTCACTTCA
GATTGTTACCAATAATAACAAGTGATGTTTTCTCGATATCATACTCTATGCACACTTACTT
TGCTTACAGATTTCTTAAATCTTGTCTTCTTAGAACTGCGACAACAAATGGTAGTCA
CCACTTCAGTAAATAACGGTAACATGTTATAGCCGTTTCTTTAATAAAGGTGGGTAATT
TGT

Carassius auratus U30386.1

GACAGAGAATGAGTGCCAGACGTATCTCAGAAGCTCACTGAACCGTTGACTTGAGGG
AGAGGAGACCATATCAGGATTACCAAGACCAGGACTTCACAGTAGAGGAGAAGATCC
TTCAGGAAAAGACTTGCCAAAAGATACAAGTTATGGTGCACATCTGCAGGCTGTTTGT
GGTGATGGGGATGTTGCTGTGTCTAAGTGCCAGTTTGCAGCTCTCAGCACTGGTC
TCATGGCTGGTATCCTGGAGGAAAGAGAGAGATAGACGTTTACGATTCCTCAGAGGT
TTCAGGGGAAATTAACCTCTGTGAGGCAGGAAAATGCAGCTACCTGAGACCCCAGGG
AAGAAACATTCTGAAGACAATACTGCTGGATGCCATCATAACGGGATTCCCAAAAGAGA
AAATGACACCAAGATGACGCAACAGCCTGTGTCCAAAGAAAAATCATTTCCAGCAAAC
ACATTAGGAGTGCAATTTCCATCCAAATTATATATATAATTATTTTGTAAATCTGTGAA
TTTTATGTTTTTTTTTTTTTTTATATATGTTTTGCAAATCGTTCTGTTCTCAAATTCATTGT
GAGTGAACCTATACTGCTAGCACTATGTAACAATTTGCAGCAGTTCCTACAATAAAGC
TTTATTTTGGTATTTTGG

Carassius auratus U40567.1

GGAGAGAATGAGCTCAGAAGCTCACTGAACCATTCACTTGAGGGAAACAAGATCATA
TCAGGGTTACCAAGACTTCACAGTCGAGGAACTACTGCAGAAGACCCTTCAGATACA
AGTTATGGTGCACATCTGCAGGCTGTTTGTGGTGATGGGGATGCTGATGTTTCTAAGT
GTCCAGTTTGCAGCTCTCAGCACTGGTCTCATGGCTGGTACCCTGGAGGAAAGAGA
GAGATAGACGTTTACGATCCTTCAGAGGTTTCAGAAGAAATCAAATCTGTAATGCAG
GGAAATGCAGCTTCTGATACCCAGGGAAAGAAACATTCTGAAGACAATACTGCTGG
ACGCCCTCACACGGGATTTCCAGAAGAGAAAGTGACACCGAGATGACGCATCAGCCC

ATGTCCAAAGAAACATCATTTCCAGCAAACACATTAGGCCTGCATTTGCATCCAAGTT
ATCCTGTGATATTTTATTTATTTATATATTTATTTATTTTTGTATATGTTCTGTATTTTTGT
TCTCGTCTCAAAGCCATTGTGAGTTAGTCTATACTGCCAGCACTATGTAACCGTTTGC
AGCAGTTCCTACAATAAAGACTTTATTTTTGGT

Oryzias latipes AB041330.1

CATGAAACTGTGAGAAACAGTAAAACACTTTAGCACCTGATCGACTTGACGAAAAGCT
TCTGCTGTTTCTGAGATTTTTGTAGTTGCATCACTGAGTTGTTTGAGACTGTAACCACT
CAGACTAAGGTAATGTCTCGGCTGGTTCTACTGCTGGGGGTGCTCTTGTATGTGGGG
GCTCAGCTATCCCAGGCTCAGCACTGGTCCCATGGTTGGTACCCCGGAGGGAAGAG
GGAGCTAGACTCCTTTGAGGTTTCAGAAGAGATGAAGCTTTGTGAGACTGGGGAATG
CAGCTACATGAGACCTCAGAGGAGGAGTTTCTTAGAAATATTGTTCTGGATGCCTTG
GCCAGAGAGCTCCAAAAAAGGAAGTGACCCTTACCTGTGATGCTGCTTTTCTACACT
GCGACTCTCTTCTTGGTATTTTTGTTTGGGAGCAACCCTGTGATCTTTCGTCTTTTTT
TGTTTTTTTTTAGCATTGCAATATTGTTCTGTTGCAAAGAAGTGTCTATTTTGGATAAC
TTTATACTTTGTCATTTTAGGATCATCTAAGCACAATGTTTCTGTCCTGTTTTTCCACTT
GAGTTCATTGTTTAAAGTTGCTTTGGTGATTA AAAACATGGAGGAAAAC

Oncorhynchus mykiss AF125973.1

ATCGAACTAAGGGTCTAAGATCCAGTGATGGTGAGTGTGGCTAGACTGGTGTTTATG
CTGGGGCTGCTGCTGTGTCTGGGAGCCAGCTGTCTTCCCTCCAGCACTGGTCCCAT
GGCTGGTACCCTGGAGGCAAGAGGGAGCTGGACTCATTACCACCTCTGAGATTTCA
GAGGAGATTAACCTCTGTGAGGCAGGAGAATGCAGCTACCTGAGACCCAGCGAAG
GAACATCCTTAAAAACGTTATTTTTGGATGCCCTGGCCAGAGAATTTCAGAAGCGAAAA
TAACCTTAGACAACCTATCAACCGTGGCTGATTTAAATCCTTCTTGTCTGTCTGTT
TCCTTCATGACCTCTATTCTAATCTCATGTGATTTGGTCCAATTTTGTGGTTCATCCAC
TTTGATAATCATATAGCATCACTCTTTACCATTGCATTCTCCTTCTGTCCCCTTTTTGCT
GCTGTAGACTATCAATTACAGATGCAACATCGTGCACATGCCATTTCTTTAATAAAGT
ATCTATTTTTGTTATT

Sparus aurata U30325.1

TTCGCCACGAGGTGAGATACTTTGAGCGACTGAAGGACAAGCAGTGGGAGCTTCTGG
CAGGACCCCTGGACAGGTGCAGAGACAAAGTTGTGAGAATTGCGAACAAGGTGGGA
ATATCATGTGTGTATCTCGGCTGGTTTTGCTGCTCGGGCTGCTTCTATGTGTGGGGG
CTCAGCTGTCCAACGGCCAGCACTGGTCCCACGGTTGGTACCCCGGAGGCAAGAGG
GAACTGGACTCTTTTGGCACATCAGAGATTTAGAGGAGATTAAGCTGTGTGAGGCA
GGGGAATGCAGCTACTTGACACCCAGAGGAGGAGTGTGCTGAGGAATATCTTGTG
GATGCTTTAGCAAGAGAGCTCCAGAAGAGGAAGTGACAGCTTTTCACTTCCAGCTGC
TTTTCTATCTATAGTACTCTCCTCTTCTTCACTATCCTGGTCTTGGTTGTGGAACAAT
TTCATGTTGATCCTGTGGTTTTGACTATTTGTTACATTTGTGAGTAAATGTGTTTTCCAG
TGTTACATGGACTTCCCCAGTGTAACAATGTCCCAATAAAAATATCTATTTTTGAA

REFERENCIAS.

- Adams, B. A., Tello, J. A., Erchegyi, J., Warby, C., Hong, D. J., Akinsanya, K. O., Makie, G. O., Vale, W., Rivier, J. E., Sherwood, N. M. 2003. Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinol.* 144, 1907-1919.
- Adams, B. A., Vickers, E. D., Warby, C., Park, M., Fischer, W. H., Grey, C. A., Rivier, J. E., Sherwood, N. M. 2002. Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biol. Reprod.* 67:0232-239.
- Amano, M., Takahashi, A., Yamanome, T., Okubo, K., Aida, K., Yamamori, K. 2002. Molecular cloning of three different GnRHs in the brain of barfin flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126: 325-333.
- Ando, H and Urano, A. 2005. Molecular regulation of gonadotropin secretion by gonadotropin-releasing hormone in salmonid fishes. *Zool. Sci.* 22: 379-389.
- Bless, E. P., Westaway, W. A., Schwarting, G. A., Tobet, S. A. 2000. Effects of gamma-aminobutyric acid(A) receptor manipulation on migrating gonadotropin-releasing hormone neurons through the entire migratory route un vivo and vitro. *Endocrinol.* 141: 1254-1262.
- Bogerd, J., Zandbergen, T., Anderson, E., 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. Biochem.* 15: 1-9.
- Bogerd, J., Diepenbroek, W. B., Hund, E., Van Oosterhout, F., Teves, A. C. C., Leurs, R., Blomenrohr, M. 2002. Two gonadotropin-releasing hormone receptor in the african catfish: no differences in ligand selectivity, but differences in tissue distribution. *Endocrinol.* 143: 4673-4682.
- Burgus, R., et al. 1972. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 278-282.
- Cárdenas, R. R. 1996. Regulación endocrina de la reproducción y el crecimiento en peces óseos. *Cienc. Des.* 131: 22-28.
- Cárdenas, R. R. 1997. Endocrinología de la reproducción en teleósteos. *Cuad. Mex. Zool.* 3 (1): 29-39.

Carolsfeld, J., Powell, J. F., Park, M., Fischer, W. H., Craig, A. G., Chang, J. P., Rivier, J. E., Sherwood, N. 2000. Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. *Endocrinol.* 141: 505-512.

Chang, J. P. and Jobin, R. M. 1994. Regulation of gonadotropin release in vertebrates: a comparison of GnRH mechanisms of action. *Perspec. Comp. Endocrinol.* Pp.41-51.

Chang, J. P., Van Goor, F., Jobin, R. M., Lo, A. 1996. GnRH signaling in goldfish pituitary cells. *Biol. Signals.* 5: 70-80.

Chang, J. P., Johnson, J. D., Van Goor, F., Wong, C. J. H., Yunker, W. K., Uretsky, A. D., Taylor, D., Jobin, R., Wong, A. O. L., Goldberg, J. I. 2000. Signal transduction mechanisms mediating secretion in gold fish gonadotropes and somatotropes. *Biochem. Cell. Biol.* 78: 139-153.

Chen, C. C., Fernald R. D. 2006. Distributions two gonadotropin-releasing hormone receptor types in a cichlid fish suggest functional specialization. *J. Comp. Neurol.* 495: 314-323.

Collins, P. M., O'Neill, D. F., Barron, B. R., Moore, R. K., Sherwood, N. M. 2001. Gonadotropin-releasing hormone content in the brain and pituitary of male and female grass rockfish (*Sebastes rastrelliger*) in relation to seasonal changes in reproductive status. *Biol. Reprod.* 65: 173-179.

Counis, R., Laverrierre, J. N., Garrel, G., Bleux, C., Cohen-Tannoudji, J., Lerrant, Y., Kottler, M. L., Magre, S. 2005. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod. Nutr. Dev.* 45: 243-254.

Dellovade, T., Schwanzel-Fukuda, G. J., Pfaff, D. 1998. Aspects of GnRH neurobiology conserved across vertebrate forms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 276-282.

Dobkin-Bekman, M., Naidich, M., Pawson, A. J., Millar, R. P., Seger, R., Naor Z. 2006. Activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) by GnRH is cell-context dependent. *Mol. Cell. Endocrinol.* In press.

Dubois, E. A., Zandbergen, M.A., Peute, J., Bogerd, J., Goos, H. J. 2001. Development of three distinct GnRH neuron populations expressing two different GnRH forms in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *J. Comp. Neurol.* 437; 308-320.

Dubois, E. A., Zandbergen, M.A., Peute, J., Goos, H. J. 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Res. Bull.* 57: 413-418.

Fernald, R. D., White, R. 1999. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure and functions. *Front. Neuroendocrinol.* 20: 224-240.

Fujii, Y., Enomoto, M., Ikemoto, T., Endo, D., Okubo, K., Aida, K., Park, M. K. 2004. Molecular cloning and characterization of a gonadotropin-releasing hormone receptor in the guinea pig, *Cavia porcellus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 136: 208-216.

Forlano, P. M., Maruska, K. P., Sower, S. A., King, J. A., Tricas, T. C. 2000. Differential distribution of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the sturgeon brain: functional and evolutionary considerations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118: 226-248.

Gavi, S., Shumay, E., Wang, H., Malbon, C.C. 2006. G-protein-coupled receptors and tyrosine kinase: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol. Metabol.* 17(2): 46-52.

Grens, K. E., Greenwood, A. K., Fernald, R. D. 2005. Two visual processing pathways are targeted by gonadotropin-releasing hormone in the retina. *Brain Behav. Evol.* 66(1): 1-9.

González-Martínez, M., Madigou, T., Zmora, N., Anglade, I., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Muñoz-Cueto, J. A., Kah, O. 2001. Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotropin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Comp. Neurol.* 429: 144-155.

Gopinath, A., Tseng, L. A., Whitlock, K. E. 2004. Temporal and spatial expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the brain of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Gene Express. Patt.* 4: 65-70.

Gorbman, A., Sower, S. A. 2003. Evolution of role of GnRH in animal (metazoan) biology. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134: 207-213.

Gothilf, Y., Muñoz-Cueto, J. A., Sagrillo, C. A., Selmanoff, M., Chen, T. T., Kah, O., Elizur, A., Zohar, Y. 1996. Tree forms of gonadotropin-releasing-hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic-acid characterization and brain localization. *Biol. Reprod.* 55: 636-645.

Guilgur, L. G., Moncaut, N. P., Canário, A. V. M., Somoza, G. M. 2006. Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. *Comp. Biochem. Physiol.* In press.

Hoffman, H. A. 2006. Gonadotropin-releasing hormone signaling in behavioral. *Neurobiol.* 16: 1-8.

Ikemoto, T., Park, M. K. 2005. Molecular and evolutionary characterization of the GnRH-II gene in the chicken: distinctive genomic organization, expression pattern, and precursor sequence. *Gene*. 1-9.

Ikemoto, T., Park, M. K. 2005. Identification and molecular characterization of three GnRH ligands and five GnRH receptor in the spotted green pufferfish. *Mol. Cell Endocrinol.* 242: 67-79.

Illing, N., Troskie, B. E., Nahorniak, C. S., Hapgood, J. P., Peter, R. E., Millar, R. P. 1999. Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 2526-2531.

Ishizaki, M., Iigo, M., Yamamoto, N., Oka, Y. 2004. Different modes of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release from multiple GnRH systems as revealed by radioimmunoassay using brain slices of a teleost, the dwarf gourami (*Colisa lalia*). *Endocrinol.* 145(2): 2092-2103.

Iwakoshi, E., Takawa-Kuroda, K., Fujisawa, Y., Hisada, M., Ukena, K., Tsutsui, K., Minakata, H. 2002. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:1187-1193.

Jimenez-Liñan, M., Rubin, B. S., King, J. C. 1997. Examination of guinea pig luteinizing hormone releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. *Endocrinol.* 138 (10): 4123-30.

Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P., de Morrison, D. 1993. The reproductive brain in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 85-90.

Karizawa, S., Kaneko, T., Hirano, T. 1997. Effects of hypothalamic factors on samatolactin secretion from the organ-cultured pituitary of rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 104: 7-19.

King, J. A., Millar, R. P. 1982. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone I. Structural determination on partially purified material. *J. Biol. Chem.* 257: 10722-10728.

King, J. A., Millar, R. P. 1995. Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cell. Mol. Neurobiol.* 15: 5-23.

Kim, M-H., Oka, Y., Amano, M., Kobayashi, M., Okuzawa, K., Hasegawa, Y., Kawashima, S., Suzuki, Y., Aida, K. 1995. Immunocytochemical localization of sGnRH and cGnRH-II in the brain of goldfish, *Carassius auratus*. J. Comp. Neurol. 356: 72-82.

Klausen, C., Chang, J. P., Habibi, H. R. 2001. The effect of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone and gonadotropin subunit gene expression in the pituitary of gold fish, *Carassius auratus*. Comp. Biochem. Physiol. 129: 511-516.

Kuo, M. W., Lou, S. W., Postlethwait, J., Chung, B. S. 2005. Chromosomal organization, evolutionary relationship, and expression of zebrafish GnRH family members. J. Biomed. Sci. 12: 629-639.

Latimer, V. S., Rodrigues, S. M., Garyfallou, V. T., Kohama, S. G., White, R. B., Fernald, R. D., Urbanski, H. F. 2000. Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH-I and GnRH-II) are expressed by two separate populations of cells in the rhesus macaque hypothalamus. Mol. Brain Res. 75: 287-292.

Lethimonier, C., Madigou, T., Muñoz, C. J. A., Lareyre, J. J., Kah, O. 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. 135: 1-16.

Leung, P.C., Cheng, C. K., Zhu, X. M. 2003. Multifactorial role of GnRH-I and GnRH-II in the human ovary. Mol. Cell. Endocrinol. 202: 145-153.

Lescheid, D. W., Rosen, G. J., Bridge, A. E., Jones, R. E., Warby, C. M., Sherwood, N. M. 1997. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is detected only in the form of chicken GnRH-II within the brain of the green anole, *Anolis carolinensis*. Gen. Comp. Endocrinol. 108:247-257.

Levavi-Sivan, B., Avitan, B. 2005. Sequence analysis, endocrine regulation, and signal transduction of GnRH receptors in the teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. 142: 67-73.

Li, W. S., Lin, H. R., Wong, A. O. 2002. Effects of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone secretion and gene expression in common carp pituitary. Comp. Biochem. Physiol. 132: 335-341.

Limonta, P., Moretti, R. M., Montagnani, M. M., Motta, M. 2003. The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front. Neuroendocrinol.* 24: 279-295.

Lin, X. W., Peter, R. E. 1996. Expression of salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II precursor messenger ribonucleic acids in the brain and ovary of goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101: 282-286.

Lin, X. W., Peter, R. E. 1997. Cloning and expression pattern of a second [His⁵Trp⁷Tyr⁸] gonadotropin-releasing hormone (chicken GnRH-II) mRNA in goldfish: evidence for two distinct genes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170: 262-272.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 6373-6377.

Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R. M., Arimura, A., Schally, A. V. 1971. Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 1334-1339.

McArdle, C. A., Franklin, T., Green, L., Hislop, J. N. 2002. Signaling, cycling and desensitization of gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Endocrinol.* 173: 1-11.

Millar, R. P. 2003. GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol. Metabol.* 14 (1): 35-43.

Millar, R. P. 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Anim. Reprod. Sci.* 88: 5-28.

Millar, R. P., Lu, Z. L., Pawson, A.J., Flanagan, C. C. A., Morgan, K., Maudsley, S. R. 2004. Gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinol. Rev.* 25: 235-275.

Miyamoto, K., Hasegawa, I., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, H., Matsuo, H. 1984. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81: 3874-3878.

Moncaut, N., Somoza, G. M., Power, D., Canario, A. 2005. Five gonadotropin-releasing hormone receptors in a teleost fish: isolation, tissue distribution and phylogenetic relationships. *J. Mol. Endocrinol.* 34: 767-779.

Montaner, A. D., Mongiant, L., Lux-Lantos, V. A. R., Park, M. K., Fischer, W. H., Craig, A. G., Rivier, J. E., Lescheid, D., Lovejoy, D., Libertun, C., Sherwood, N. M., Somoza, G. M. 2001. Structure and biological activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) isoforms isolated from rat and hamster brains. *Neuroendocrinol.* 74: 202-212.

Morgan, K. and Millar, P. 2004. Evolution of GnRH ligand precursors and GnRH receptors in protochordate and vertebrate species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139: 191-197.

Mousa, M. A., Mousa, S. A. 2003. Immunohistochemical localization of gonadotropin-releasing hormones in the brain and pituitary gland of the Nile perch, *Lates niloticus* (Teleostei, Centropomidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 130: 245-255.

Muske, L. E. 1997. Organization of multiple molecular forms of GnRH. In: Parhar, I. S., Sakuma, Y. GnRH neurons: gene to behavior. Brain Shuppan, Japan. 145-180.

Mylonas, C. C. and Zohar, Y. 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev. Fish. Biol. Fisher.* 10: 463-491.

Ngamvongchon, S., Lovejoy, D.A., Fisher, W. H., Craig, A. G., Nahorniak, C. S. and Peter, R. E., Habibi, H. R., Marchant, T. A. and Nahorniak, C. S. 1990. Vertebrate gonadotropin-releasing hormones: phylogeny and structure-function relationships. *Ann. N. Y. Acad. Sci. New York. U.S.A.* 210-223.

Ogawa, S., Akiyama, G., Kato, S., Soga, T., Sakuma, Y., Parhar, I. S. 2006. Immunoneutralization of gonadotropin-releasing hormone type-III suppresses male reproductive behavior of cichlids. *Neurosci. Letters.* 403: 201-205.

Okubo, K., Suetake, H., Aida, K. 1999. Expression of two gonadotropin-releasing hormone (GnRH) precursor genes in various tissues of the Japanese eel and evolution of GnRH. *Zool. Sci.* 16: 471-478.

Okubo, K., Aida, K. 2001. Gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) in a primitive teleost, the arowana: phylogenetic evidence that three paralogous lineages of GnRH occurred prior to the emergence of teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.* 124: 125-133.

Okubo, K., Amano, M., Yoshiura, Y., Suetake, H., Aida, K. 2000. A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Orizias latipes*. *Biochem. Biophysiol. Res. Comm.* 276: 298-303.

Okuzawa, K., Gen, K., Bruysters, M., Bogerd, J., Gothilf, Y., Zohar, Y., Kagawa, H. 2003. Seasonal variation of the three native gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acids levels in the brain of female red seabream. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130: 324-332.

Okuzawa, K., Granneman, J., Bogerd, J., Goos, H.J.T., Zohar, Y., Kagawa, H. 1997. Distinct expression of GnRH genes in the red seabream brain. *Physiol. Biochem.* 17: 71-79.

Parhar, I. S. 1997. GnRH in tilapia: three genes, three origins and their roles. In: Parhar, I. S., Sakuma, Y. *GnRH neurons: gene to behavior*. Brain Shuppan, Japan. 99-123.

Parhar, I. S., Soga, T., Ishikawa, Y., Nagahama, Y., Sakuma, Y. 1998a. Neurons synthesizing gonadotropin-releasing hormone mRNA subtypes have multiple developmental origins in the medaka. *J. Comp. Neurol.* 401: 217-226.

Parhar, I. S., Soga, T., Sakuma, S. 1998b. Quantitative *in situ* hybridization of three gonadotropin-releasing hormone encoding mRNAs in castrated and progesterone treated male tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 406-414.

Parhar, I. S., Ogawa, S., Sakuma, Y. 2005. Three GnRH receptor types in laser-captured single cells of the cichlid pituitary display cellular and functional heterogeneity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 102: 2204-2209.

Pati, D. and Habibi, H. 1993. Characterization of gonadotropin-releasing hormone receptors in goldfish ovary: variation during follicular development. *Am. J. Physiol.* 264: 227-234.

Pelington, M. C., Williams, M. A., Sumpter, J. P., Rand-Weaver, M., Hoole, D., Arme, C. 1997. Isolation and characterisation of mRNA encoding the salmon- and chicken-II type gonadotropin-releasing hormones in the teleost fish *Rutilus rutilus* (cyprinidae). *J. Mol. Endocrinol.* 19: 337-346.

Peter, R. E., Habibi, H. R., Marchant, T. A., Nahorniak, C. S. 1990. Vertebrate gonadotropin-releasing hormone: phylogeny and structure-function relationships. *Topic. Rel. Put. Term. Part V.* 299-309.

Powell, J. F., Reska-Skinner, S. M., Prakash, M. O., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 10461-10464.

Powell, J. F., Zohar, Y., Elizur, A., Park, M., Fischer, W. H., Craig, A. G., Rivier, J. E., Lovejoy, D. A., Sherwood, N. 1994. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 12081-12085.

Quanbeck, C., Sherwood, N. M., Millar, R. P., Terasawa, E. 1997. Two populations of luteinizing hormone-releasing gonadotropin hormone neurons in the forebrain of the resus macaque during embryonic development. *J. Comp. Neurol.* 380: 293-309.

Reinhart, J., Mertz, L. M., Catt, K. J. 1992. Molecular cloning and expression of cDNA coding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 21281-21284.

Rissman, E. F. 1996. Behavioral regulation of gonadotropin-releasing hormone. *Biol. Reprod.* 54: 413-419.

Roy, P., Datta, M., Dagsgupta, S., Bhattacharya, S. 2000. Gonadotropin-releasing hormone stimulates thyroid activity in a freshwater Muriel, *Channa gachau* (ham.) and *Cirrhinus mrigala* (ham.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 117: 456-463.

Ruf, F., Sealfon, S. T. 2004. Genomics view of gonadotrope signaling circuits. *Trens Endocrinol. Metabol.* 15 (7): 332-338.

Schwartz, G. A., Kostek, C., Bless, E. P., Ahmad, N. N., Tobet, S. A. 2001. Deleted in colorectal cancer (DCC) regulates the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the basal forebrain. *J. Neurosci.* 21: 911-919.

Sealfon, S. C., Weisman, H and Millar, R. P. 1997. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinol. Rev.* 18: 180-205.

Sharp, P. J. Talbot, R. T., Main, G. M., Dunn, I. C., Fraser, H. M., Huskisson, N. S. 1990. Physiological roles of chicken LHRH-I and -II in the control of gonadotropin release in the domestic chicken. *J. Endocrinol.* 124: 291-299.

Sherwood, N. M. 1992. Primary structure of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 3: 17-22.

Sherwood, N. M., Adams, B. A. 2005. Gonadotropin-releasing hormone in fish: evolution, expression and regulation of the gene. World Sci. Publis. Co. Singapore.

Sherwood, N. M., Eiden, L., Brownstein, M. Spiess, J., Vale, W. 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 2794-2798.

Sherwood, N. M., Loveloy, D. A., Coe, I. R. 1993. Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocrinol. Rev.* 14 (2): 241-254.

Sherwood, N. M., Parker, D. B., McRoy, J. E., Lescheid, D. W. 1994. Molecular evolution of GHRH and GnRH. *Mol. Endocrinol. Fish.* 13: 29-66.

Sherwood, N. M., Von Schalburg, K., Lescheid, D. W. 1997. Origin and evolution of GnRH in vertebrate and invertebrates. In: Parhar, I. S., Sakuma, Y. GnRH neurons: gene to behavior. Brain Shuppan, Japan. 3-25.

Soga, T., Ogawa, S., Millar, R. P., Sakuma, Y., Parhar, I. S. 2005. Localization of three types and GnRH receptors in the brain of a cichlid fish: insights into their neuroendocrine and neuromodulator functions. *J. Comp. Neurol.* 487: 28-41.

Somoza, G. M., Miranda, L. A., Strobl-Mazulla, P., Gastón, L. G. 2002. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22: 589-604.

Sower, S. A., Chiang, Y. C., Lovas, S., and Colon, J. M. 1993. Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinol.* 132: 1125-1131.

Stefano, A. V. Aldana, -Marcos, H. J., Affanni, J. M., Somoza, G. M. 2000. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems in the pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *Fish Physiol. Biochem.* 23: 215-223.

Stefano, A. V., Vissio, P. G., Paz, D. A., Somoza, G. M., Maggese, M. C., Barrantes, G. E. 1999. Colocalization of GnRh binding sites with gonadotropin-, somatolactin-, y prolactin- expressing pituitary cells of the pejerrey *Odontesthes bonariensis*, in vitro. Gen. Comp. Endocrinol. 116: 133-139.

Steven, C., Lehnen, N., Kight, K., Ijiri, S., Klenke, U., Harris, W. A., Zohar, Y. 2003. Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. Gen. Comp. Endocrinol. 133: 27-37.

Taniyama, S., Kitahasi, T., Ando, H., Kaeriyama, M., Zohar, T., Ueda, H., Urano, A. 2000. Effects of gonadotropin-releaing hormone analog on expression of genes encoding the growth hormone/prolactin/somatolactin family and a pituitary-specific transcription factor in the pituitaries of prespawning sockeye salmon. Gen. Comp. Endocrinol. 118: 418-424.

Tobet, S. A., Chickering, T. W., King, J. C., Stopa, E. G., Kim, K., Kuo-LeBlank, V., Schwarting, G. A. 1996. Expression of gamma-aminobutyric acid and gonadotropin-releasing hormone during neuronal migration through the olfactory system. Endocrinol. 137: 5415-5420.

Tobet, S. A., Bless, E. P., Schwarting, G. A. 2001. Developmental aspect of the gonadotropin-releasing hormone system. Mol. Cell. Endocrinol. 185: 173-184.

Troskie, B., Illing, W., Rumbak, E., Sun, Y. M., Hapgood, J., Sealton, S., Conklin, D., Millar, R. P. 1998. Identification of three putative GnRH receptor subtypes in vertebrates. Gen. Comp. Endocrinol. 112: 296-302.

Trudeau, V. L., Somoza, G. M., Nahorniak, C. S., Peter, R. E. 1992. Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. Neuroendocrinol. 56: 483-490.

Tsai, P. S. 2006. Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function and evolution. Gen. Comp. Endocrinol. 148: 48-53.

Urbanski, H. F., White, R. B., Fernald, R. D. Kohama, S. G., Garyfallou, V. T., Desmore, V. S. 1999. Regional expression of mRNA encoding a second form of gonadotropin-releasing hormone in the macaque brain. Endocrinol. 140(4): 1945-1948.

Vickers, E. D., Laberge, F., Adams, B. A., Hara, T. J., Sherwood, N. M. 2004. Cloning and localization of three forms of gonadotropin-releasing hormone, including the novel whitefish form, in a salmonid, *Coregonus clupeaformis*. Biol. Reprod. 70: 1136-1146.

Weber, G. M., Powell, J. F. F., Park, M., Fischer, W. H., Craig, A. G., Rivier, J. E., Nanakorn, U., Pahar, I. S., Ngamvongchon, S., Grau, E. G., Sherwood, N. M. 1997. Evidence that gonadotropin releasing hormone (GnRH) functions as a prolactin releasing factor in a teleost fish (*Oreochromis mossambicus*) and primary structure for three native GnRH molecules. J. Endocrinol. 155: 121-132.

Wetsel, W. C., Srinivasan, S. 2002. Pro-GnRH processing. Prog. Brain Res. 141: 221-241.

Wetsel, W. C., Valenca, M. M., Merchentaler, I., Liposits, Z., Lopez, F. J., Weiner, R. I., Mellon, P. L., Negro-Vilar, A. 1991. Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized LHRH-secreting neurons. Proc. Natl. Sci. Acad. U. S. A. 92: 8363-8367.

Wierman, M. E., Pawlowski, J. E., Allen, M. P., Xu, M., Linseman, D. A., Nielsen-Preiss, S. 2004. Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone neural migration. Trends Endocrinol. Metabol. 15 (3): 96-102.

White, S. A., Katen, T. L., Bond, C. T., Adelman, J. P., Fernald, R. D. 1995. Three gonadotropin releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92: 8363-8367.

Whitlock, K. E. 2005. Origin and development of GnRH neurons. Trend Endocrinol. Metabolism. 16 (4): 145-151.

Wirsig-Wiechmann, C. R. 2001. Function of gonadotropin-releasing hormone in olfaction. Keio J. Med. 50 (2): 81-85.

Yamamoto, N. 2003. Three gonadotropin-releasing hormone neurons groups with special reference to teleost. Anat. Sci. Int. 78: 139-155.

Yoo, M. S., Kang, H. M., Choi, H. S., Kim, J. W., Troskie, B. E., Millar, R. P., Kwon, H. B. 2000. Molecular cloning, distribution and pharmacological characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone ([Trp8] GnRH) in frog brain. Mol. Cell. Endocrinol. 164: 197-204.

Yu, K. L., Lin, X. W., Da Cunha, J. B., Peter, R. E. 1997. Neuronal regulation of GnRH in teleost fishes. In: Parhar, I. S., Sakuma, Y. GnRH neurons: gene to behavior. Brain Shuppan, Japan. 276-310.