



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA.**

"GnRH en peces teleósteos con referencia a sGnRH. Aspectos evolutivos, reproductivos, y funcionales".

TESINA.

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO.

P R E S E N T A

BEATRIZ MACEDO GARZÓN.

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.

*Y el final de toda nuestra exploración
será llegar a donde comenzamos y conocer
el lugar por primera vez.*

T.S. Eliot (1942)

*Gracias sol, gracias
brisa, gracias color,
gracias día...La vida es un instante,
no es edad,
ni es tiempo....*

AGRADECIMIENTOS.

Quiero dedicar esta Tesina a las personas que de alguna manera han creído en la capacidad que tengo como persona y me han apoyado en todo este tiempo.

A mis padres, Don Richard y Doña Sonia. A mis hermanos, Vivis, Piolo, Andrea y Ricardo.

Al Dr. Rodolfo Cárdenas Regadas, por aguantarme durante “todo” este tiempo y darme la oportunidad de poder realizar este trabajo. Además por brindarme su amistad, apoyo y sobre todo, el pensar que puedo ser una mejor persona.

A la Biol. Mónica Chávez Maldonado, por el tiempo dedicado y haberme apoyado y haber aportado muchas cualidades a mi persona.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco, por aportar ideas y en su momento, haberme dado la confianza de entrar a su laboratorio.

A la Dra. Juana Alba Luis Díaz, gracias por la paciencia en la revisión de este trabajo, así como las sugerencias hechas a lo largo del mismo.

A la casi Dra. Leticia Verdín Terán, por darme el tiempo necesario para poder culminar con este trabajo.

A todos los profesores que me han enseñado muchas cosas a lo largo de mi estancia en esta escuela, gracias Jefe Luis, Ignacio Peñalosa, José Martínez, Roberto Moreno, Diego Arenas, Marcial, Alba Márquez.

A mis compadres, Gyovana y Sócrates y a Alfredo, por su gran apoyo y haber pasado muchas cosas juntos, dentro y fuera de la escuela.

A Efraín, muchísimas gracias por todo este tiempo y estar conmigo en muchos momentos y etapas de mi vida, sobre todo por aceptarme con todos mis defectos.

A mis amiguísimos de la carrera y demás: Rafa, Uli, Uriel, David, Inti, Bere, Chos, Ale, Manolo, Yola, Nayo, Aldo, Osvi, Martín, Vladimir, Paulo, Augusto, Lalo, Ramón, Abuelo, Aurora, Mariana, Toño, Marco, Ely, Faby Luis, Chivo, Liliana, Axa, Mudo, Omar, Chuchote, Gloria, a las chaparras, Dany, Beto Chekus Sandrita, Marta, Reynita, Voz, Patas, Ricardo, Diego y más....

A la familia Ancona: Nancy, Chipó, Beto, Fer, Sergio, Lupita y Carlos, por sus grandes años de amistad.

A Carolina, por su agradable compañía, amistad y por siempre tener una palabra de aliento.

A mis amigos del CCH, Ana Ivonne, Angelín y Maribel, por su gran amistad, apoyo y sus sabias palabras de aliento.

Es muy larga la lista, pero de antemano, si olvide a alguien, creo que lo sabrán entender. A todos les doy las gracias....

Índice.

Resumen	1
Introducción	2
Justificación	5
Objetivos	6
Material y Método	7
Capitulo I. Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)	8
Capitulo II. Nomenclatura de la GnRH	12
Capitulo III. Genes de la GnRH	14
Capitulo IV. Mensajeros de la GnRH	18
Capitulo V. Proteína de la GnRH	23
Capitulo VI. Origen de la GnRH	25
Capitulo VII. Distribución de la GnRH	28
Capitulo VIII. Función de la GnRH	32
Capitulo IX. Receptor y señales de transducción	35
Capitulo X. Evolución de la sGnRH	45
Capitulo XI. Uso de la sGnRH y sus análogos.	47
Discusión	50
Conclusiones	53
Referencias	54

Resumen.

Las GnRHs corresponden a un grupo de neuropéptidos, los cuales fueron aislados del hipotálamo de mamíferos. Sucesivamente, con los avances en las técnicas como la inmunohistoquímica, HPLC, PCR e hibridación *in situ*, se han encontrado hasta la fecha 24 variantes, 8 de estas se encuentran dentro del grupo de los peces teleósteos. Estas hormonas tienen un papel importante sobre los procesos reproductivos, debido a que regula la síntesis y la liberación de las gonadotropinas (LH y FSH). Dentro de este grupo de vertebrados, se localiza la GnRH de tipo salmón (sGnRH), esta se localiza principalmente en el área preóptica y telencéfalo, teniendo como funciones la de neuromodulador, parácrina e hipofisiotrópica. Cabe destacar que, con los conocimientos de su biología molecular, se han podido explicar los mecanismos de regulación para muchas especies de peces, incluidos a los de la familia de los salmónidos. Esto a través de rutas e interacciones con otras células, incluso con otros sistemas de las GnRH, dependiendo el número y localización de las isoformas. Teniendo la presencia de receptores específicos para cada isoforma. Con los datos obtenidos y pudiendo entender su participación en los procesos reproductivos, se han obtenido fármacos análogos de la sGnRH (GnRH_a), los cuales cada vez son más eficaces, para una mejor producción de gametos en especies de interés comercial y de ornato.

Introducción.

Los peces óseos constituyen el grupo más abundante de los vertebrados, incluyendo alrededor de 20 mil especies. Estos organismos habitan principalmente en aguas dulces, salobres y marinas. Son considerados como una muy buena fuente de alimento, por tener una abundante cantidad de proteínas (Osornio, 2001). Además, su demanda se ha incrementado por el rápido crecimiento poblacional humano y se han tenido que desarrollar diversas técnicas para el mantenimiento, crecimiento y reproducción de especies de importancia comercial y de ornato, cuya finalidad es la obtención de una mejor y mayor producción de crías (Cárdenas, 1996).

Una de las ramas de la biología, la endocrinología, permite tener un mejor entendimiento de los mecanismos implicados en el crecimiento y la reproducción. Ello permite que estos conocimientos sean aplicados para un mejor aprovechamiento para la explotación de este recurso. Nos enfocaremos principalmente a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que participa en los procesos reproductivos y de crecimiento.

Para el caso de los vertebrados, incluidos los peces teleósteos, los sucesos reproductivos, implican la actuación de un gran número de eventos muy complejos. Estos van a estar regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, esta última recibe una serie de informaciones necesarias, dadas a través de diversas condiciones fisiológicas y ambientales, dependiendo de cada especie (Fernández-Fernández *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2005; Amano, *et al.*, 2002; Kobayashi, *et al.*, 1997).

Para que se inicien los procesos reproductivos, el cerebro tiene que integrar la información proveniente de factores ambientales (temperatura, fotoperiodo, osmolaridad, alimento, feromonas, etc.) con las condiciones reproductivas en que se encuentra el organismo (estación en el ciclo sexual, sexo del individuo, edad, etc.) (Dickey & Swanson, 2000; Gur *et al.*, 2000; Hassin *et al.*, 1998; Kitahashi *et al.*, 1998; Melamed, *et al.*, 2000). Estos factores actuarán para que en el momento adecuado se pueda estimular a través de señales a las neuronas que se encuentran en el hipotálamo, principalmente, en donde se sintetizan y se liberan la GnRH y así iniciar la cascada de respuestas del eje reproductivo (Onuma *et al.*, 2005).

La GnRH, es un decapeptido que se sintetiza especialmente en las células neurosecretoras del Área preóptica (POA) e hipotálamo. En los tetrápodos, la hormona va a ser transportada por el sistema portahipofisiario, mientras que en los teleósteos la entrega es por vía directa a través de las terminaciones axonales. La GnRH estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas (GtHs) por medio de receptores específicos. Las GtHs son la Hormona Luteinizante y Hormona Folículo Estimulante (LH y FSH, respectivamente), y son producidas por las células gonadotropas, se ubican en la parte anterior de la hipófisis (Sealfon *et al.*, 1997). Para el caso de los peces óseos, se han descrito dos formas análogas, la GTH-I y la GTH-II (Querat *et al.*, 2000). Ambas están conformadas por dos subunidades distintas, una α y β , las cuales están unidas no covalente entre sí. La subunidad α , es la más conservada en su secuencia, para ambas gonadotropinas y la fracción β , muestra menos homología (Counis *et al.*, 2005). La FSH y LH viajan por el torrente sanguíneo hacia las gónadas, en donde inducen principalmente el proceso de gametogénesis, además, de modular la producción de hormonas esteroides sexuales (Yu, *et al.*, 1997). La función de ambas gonadotropinas es diferente. En las hembras la LH, estimula fundamentalmente la ovogénesis, ovulación y formación de cuerpo lúteo, así como la síntesis de progesterona, y en los machos la secreción de andrógenos; mientras que la FSH en hembras, induce el crecimiento y maduración de los folículos ováricos y en machos, la espermatogénesis. Su biosíntesis y su secreción, depende de la actividad de la GnRH (Enomoto & Kyun 2004; Kaiser *et al.*, 1997; Millar, 2005).

Los esteroides sexuales además de promover la gametogénesis (Kim *et al.*, 2006), extragonadalmente, actúan como neuromoduladores en el encéfalo incluyendo al hipotálamo, así como en la hipófisis (Scheider *et al.*, 2006; Millar, 2005; Kaiser *et al.*, 1997). Estableciéndose así una retroalimentación en el eje reproductivo.

En los últimos 30 años se han descrito un total de 24 isoformas de GnRHs en el cerebro o estructuras equivalentes (Tsai, 2006; Adams, 2002). De estas isoformas, 7 están presentes en el cerebro de peces teleósteos, las cuales son conocidas como: GnRH de salmón (sGnRH), GnRH de pollo II (cGnRH-II), GnRH de mamífero (mGnRH), GnRH de lúmina (sbGnRH), GnRH de bagre (cfGnRH), GnRH de arenque (hrGnRH), GnRH de medada (mdGnRH) o pejerrey (pjGnRH) (Lethimonier *et al.*, 2004; Somoza *et al.*, 2002).

Estas son nombradas de acuerdo a la especie de la cual fueron aisladas originalmente (Yu *et al.*, 1997; Stefano *et al.*, 2000; Amano *et al.*, 2002; Zmora, 2002).

Todas las GnRHs se identifican por la conservación de los residuos N-terminal (pGlu-His-Trp-Ser) y los residuos C-terminal (Pro-Gly-NH₂) que permanecen constantes en las variantes de la molécula. Las excepciones a ello son la hormona que se extrajo del conejillo de indias (pgGnRH) y la de la lamprea (IGnRH-I), las cuales en sus residuos N-terminal, presentan sustituciones. La primera de ellas en la posición dos y la otra en la posición tres. En peces cartilagosos, teleósteos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, todas las GnRHs han sido descritas con la presencia de un residuo de glicina en la posición seis (Tabla 1) (Barran *et al.*, 2005).

En 1983, para los peces teleósteos se aisló de encéfalos de hembras del salmón (*Onchorhynchus keta*), la primera molécula de la GnRH, la cual se asignó con las siglas de sGnRH, de acuerdo a la nomenclatura convencional. Estudios posteriores han demostrado que esta isoforma, está presente en un gran número de especies de peces óseos, inclusive, se ha reportado en algunas especies de reptiles y en una especie de mamífero, el capibara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) (Clarke & Pompolo, 2005; Carosfeld, 2000; Montaner *et al.*, 1999).

En salmónidos, se han encontrado dos genes que codifican para el mismo péptido, así como dos mRNAs. A estos genes se les han asignado los nombres de sGnRH-I y de sGnRH-II, respectivamente, los cuales son aproximadamente 453 pb y 481 pb. Ambos se expresan en el cerebro. Además a los mensajeros se conocen como mRNA-1 y mRNA2. La expresión de ambos se encuentra acorde a la etapa reproductiva en la que se encuentre el organismo (Gray, *et al.*, 2002; Ferriere, *et al.*, 2001).

Por otro lado, en diversas investigaciones se han descrito en gasterópodos de la especie *Aplysia californica* (Tsai *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000), en bivalvos (Pazos & Mathieu, 1999), cefalópodos (Di Cosmo & Di Cristo, 1998), cnidarios (Anctil, 2000) y platelmintos (Anctil & Tekaya, 2005), la presencia de moléculas bioactivas que, inmunológica y bioquímicamente, tienen funciones similares a la GnRH de los vertebrados. El dato más reciente, es el aislamiento de un dodecapéptido presente en el Sistema Nervioso Central en una especie de pulpo, con funciones similares a la GnRH (Iwakoshi *et al.*, 2002).

Justificación

En el control de la reproducción depende de la interacción de múltiples factores, esta regulación es ejercida principalmente por la GnRH. Como su nombre lo indica, este constituye el principal factor cerebral implicado en la estimulación de la síntesis y liberación de las gonadotropinas hipofisarias, LH y FSH. Además, de estar implicada en la modulación de conductas sexuales y de anidamiento. Así que, el esclarecimiento de la organización de estos sistemas, puede aportar información valiosa que favorezcan el conocimiento y el control del ciclo reproductivo.

Debido a la importancia de este tipo de moléculas es primordial contar con la información necesaria para poder entender el papel de las GnRHs descritas hasta la fecha, tanto en los procesos reproductivos como en su participación en la regulación de otros fenómenos como el crecimiento y la neuromodulación, incluyendo los hallazgos reportados para vertebrados como en invertebrados, por lo cual sugiere que la GnRH surgió tempranamente durante la evolución. Su presencia ha persistido y se ha ampliado entre los diversos *phyla* (Tsai, 2006).

Objetivo general:

- Analizar con base en la revisión bibliográfica actualizada, los aspectos moleculares, evolutivos, reproductivos y funcionales de la GnRH, en los peces teleósteos.

Objetivos particulares:

- Establecer los mecanismos de regulación de la GnRH en los peces teleósteos, en especial de la isoforma sGnRH.
- Describir los diferentes aspectos moleculares, evolutivos, reproductivos y funcionales de la isoforma sGnRH en dichos organismos.
- Establecer la importancia de aspectos moleculares, evolutivos, reproductivos y funcionales de la isoforma sGnRH.

Material y métodos:

Para cumplir con los objetivos planteados en la presente tesina, se realizó una revisión bibliográfica actualizada. Esto se hizo a través de revistas científicas internacionales que publican trabajos con la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), especialmente, enfocándose a la isoforma conocida como sGnRH, y con referencia en particular a los peces teleósteos.

La información recopilada, fue leída, interpretada, analizada y utilizada para la realización de un escrito en donde se describieron los aspectos más importantes sobre los distintos mecanismos de la isoforma sGnRH, así como evolutivos, reproductivos y funcionales de esta neurohormona.

Capítulo I. Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH).

El primer nombre que se le dio a la GnRH, fue el de la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (LHRH) (Harris, 1950). Se le asignó por el efecto estimulante de dicha hormona, para la liberación de la LH. Tiempo después, se le designó un nombre más general, el de la GnRH, el cual hasta la fecha ha resultado ser el más adecuado.

La GnRH, fue aislada del tejido hipotalámico de mamíferos placentados (cerdos y ovejas) (Kasten *et al.*, 1996). La molécula está formada por diez aminoácidos. A esta isoforma se le nombró mGnRH (Amoss, *et al.*, 1971). Tiempo después, con el uso de técnicas como la secuenciación, se encontró que existe una variante de esta molécula, la cual es originada por el mismo gen pero que tiene una hidroxiprolina en la posición 9 y se le llama ([Hyp9]GnRH). Esta variante, es generada por una modificación enzimática postraduccional a través de la prolil-endopeptidasa (Gautron *et al.*, 2005; Gautron *et al.*, 1991; Montaner *et al.*, 2001). Se ha reportado que se encuentra principalmente en encéfalos de ratas, hámsters, perros y algunas especies de ranas (Gautron, 1991; Montaner, 2001).

A través de distintas técnicas, como la obtención de la estructura complementaria del ADN (cDNA) y HPLC, la identificación de nuevos miembros de la familia de la GnRH en todos los vertebrados se ha ido incrementando rápidamente.

Se han descrito 24 isoformas para la GnRH para cordados (Tsai *et al.*, 2006), se han encontrado en invertebrados como el moluscos, cefalópodos (*Octopus vulgaris*), bivalvos, gasterópodos (Ivakoshi *et al.*, 2002), incluso en platelmintos (Anctil, 2000).

Varias investigaciones, muestran la presencia de moléculas bioactivas que inmunológicamente y bioquímicamente, tienen funciones similares a la GnRH presente en los vertebrados, presentándose en gasterópodos, en la especie *Aplysia californica* (Tsai *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000), bivalvos (Pazos & Mathieu, 1999), cefalópodos (Di Cosmo & Di Cristo, 1998), cnidarios (Anctil, 2000) y platelmintos (Anctil & Tekaya, 2005). Estimándose que, el posible origen de la hormona es desde hace 600 millones de años,

por lo cual, se considera que esta neurohormona es antigua y con una secuencia muy conservada.

Además, 7 isoformas están presentes en el cerebro de teleósteos, las cuales se identifican como: GnRH de pollo II (cGnRH-II), GnRH de salmón (sGnRH), GnRH de mamífero (mGnRH), GnRH de robalo (sbGnRH), GnRH de bagre (cfGnRH), GnRH de arenque (hrGnRH), GnRH de medaka (mdGnRH) (Lethimonier, *et al.*, 2004; Somoza, *et al.*, 2002).

La identificación de nuevas isoformas para la GnRH, se define por la diferencia que existe entre las secuencias de aminoácidos, las cuales, son comparadas con la isoforma de mGnRH.

Aunque en todos los vertebrados, la secuencia de aminoácidos para las isoformas de la GnRH es similar, presenta regiones conservadas, las cuales se encuentran principalmente en las posiciones 1, 4, 9 y 10 (Tabla 1) (Myers & Patonay, 2006; Lethimonier, *et al.*, 2004; Okubo, *et al.*, 2000; Somoza *et al.*, 2002).

GnRH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Referencias
Vertebrados											
mGnRH	p-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂	Baba, <i>et al.</i> , 1971.
sbGnRH	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	Powell, <i>et al.</i> , 1994.
sGnRH	-	-	-	-	-	-	Trp	Leu	-	-	Sherwood, <i>et al.</i> , 1983.
wfGnRH	-	-	-	-	-	-	Met	Asn	-	-	Adams, <i>et al.</i> , 2002.
cfGnRH	-	-	-	-	His	-	-	Pro	-	-	Bogerd, <i>et al.</i> , 1994.
hrGnRH	-	-	-	-	His	-	-	Ser	-	-	Carosfeld, <i>et al.</i> , 2000.
pjGnRH	-	-	-	-	Phe	-	-	Ser	-	-	Montaner, <i>et al.</i> , 2001;
mdGnRH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Somoza, <i>et al.</i> , 2002.
dfGnRH	-	-	-	-	His	-	Trp	Leu	-	-	Lovejoy, <i>et al.</i> , 1992.
cGnRH-II	-	-	-	-	His	-	Trp	Tyr	-	-	Miyamoto, <i>et al.</i> , 1984.
cGnRH-I	-	-	-	-	His	-	Trp	Gln	-	-	King, & Millar 1982.
rGnRH	-	-	-	-	-	-	-	Trp	-	-	Yoo, <i>et al.</i> , 2000.
gpGnRH	-	Tyr	-	-	-	-	Val	-	-	-	Jimenez-Linan <i>et al.</i> , 1997.
IGnRH-I	-	-	Tyr	-	Leu	Glu	Trp	Lys	-	-	Showers, <i>et al.</i> , 1993.
IGnRH-III	-	-	-	-	His	Asp	Trp	Lys	-	-	Showers, <i>et al.</i> , 1993.

Cordados y no cordados											
tGnRH- I	-	-	-	-	Asp	Tyr	Phe	Lys	-	-	Powell, <i>et al.</i> , 1996.
tGnRH- II	-	-	-	-	Leu	Cys	His	Ala	-	-	Powell, <i>et al.</i> , 1996.
tGnRH- III	-	-	-	-	-	Glu	Phe	Met	-	-	Ancil, 2001.
tGnRH- IV	-	-	-	-	Asn	Gln	-	Thr	-	-	Adams, <i>et al.</i> , 2003.
tGnRH- V	-	-	-	-	-	Glu	Tyr	Met	-	-	Adams, <i>et al.</i> , 2003.
tGnRH- VI	-	-	-	-	Lys	-	Tyr	Ser	-	-	Adams, <i>et al.</i> , 2003.
tGnRH-VII	-	-	-	-	-	Ala	-	Ser	-	-	Adams, <i>et al.</i> , 2003.
tGnRH-VIII	-	-	-	-	Leu	Ala	-	Ser	-	-	Adams, <i>et al.</i> , 2003.
oGnRH	-	Asn	Tyr	Phe	-	Asn	-	Trp	His	-	Ivakoshi, <i>et al.</i> , 2002.

Tabla 1. Estructura primaria de las secuencias de aminoácidos de las 23 isoformas de GnRH identificadas en vertebrados e invertebrados. GnRH de mamífero (mGnRH), GnRH de pollo I (cGnRH- I), GnRH de rana (rGnRH), GnRH de lúbina (sbGnRH), GnRH de pez blanco (wfGnRH), GnRH de bagre (cfGnRH), GnRH de arenque (hrGnRH), GnRH de medaka (mdGnRH) o GnRH de pejerrey (pjGnRH), GnRH de pez perro (dfGnRH), GnRH de pollo II (cGnRH-II), GnRH del conejillo de indias (pgGnRH), GnRH de lamprea I y I I I (lGnRH), GnRH de tunicado I -VI I I (tGnRH) y GnRH de pulpo (oGnRH). Abreviaciones de los distintos aminoácidos: Ácido glutámico (Glu), Histidina (His), Triptofano (Trp), Serina (Ser), Tirosina (Tyr), Glicina (Gly), Leucina (Leu), Arginina (Arg), Prolina (Pro), Ácido aspártico (Ans), Glutamina (Gln), Metionina (Met), Fenilalanina (Phe), Alanina (Ala) (Modificada de Lethimonier, *et al.*, 2004; Okubo *et al.*, 2000; Somoza *et al.*, 2002).

Capítulo II. Nomenclatura de las GnRHs.

Como se mencionó anteriormente, un criterio para identificar a las diversas isoformas de la GnRH, es anteponiendo a las siglas de la hormona, con letra minúscula la inicial del nombre común de la especie en donde fue aislada por primera vez dicha hormona. Por ejemplo, para el caso de los salmónidos, se le asignó el nombre de la sGnRH (Yu, *et al.*, 1997; Stefano, *et al.*, 2000; Amano, *et al.*, 2002; Zmora, 2002).

Se cree que con la adquisición de nuevos conocimientos, acerca de la GnRH, como los son, la estructura de las isoformas, su distribución en el encéfalo y el establecimiento de funciones adicionales en que participa la molécula, por mencionar las más importantes, este tipo de nomenclatura será sustituida, pues no provee más información que su fuente de origen, y de manera intrínseca su secuencia.

Es por eso que, a través de varios análisis bioinformáticos, como el del vecino más cercano, así como algunos análisis filogenéticos, Fernald y White (1999), han propuesto una nomenclatura, en donde se puedan identificar los genes y los péptidos para la GnRH. En el caso de los genes, tanto en humanos, como en mamíferos, el gen que codifica para la conocida mGnRH, se le denominará GNRH1. El segundo gen, que se encuentra presente en todos los vertebrados y que codifica para la isoforma más conservada, conocida comúnmente como la cGnRH-II, se le designará como GNRH2, para los mamíferos y Gnrh2, en los no mamíferos.

En el caso de que existiera un gen que codifique para una tercera isoforma, el cual se ha encontrado en muchas especies de teleósteos, pero aún no ha sido localizada en mamíferos, llamada sGnRH, se le nombrará como Gnrh3.

Recientemente, se ha podido realizar un árbol filogenético mostrando la existencia de tres agrupamientos, en los cuales, las distintas isoformas de la GnRH se expresan en tres diferentes áreas del cerebro. Permitiendo definir la función de cada isoforma de GnRH.

La isoforma que se distribuya abundantemente en el área del hipotálamo y que esta relacionada con el control de la función de la hipófisis, se le denominará GnRH1. GnRH2, se encuentra distribuida en el cerebro medio (cGnRH-II) y finalmente, GnRH3, en las

neuronas que se localizan en el telencéfalo (sGnRH). Sin embargo, este tipo de nomenclatura no distingue entre las diferentes isoformas de la hormona encontradas en el hipotálamo de las distintas especies.

Realizando árboles filogenéticos que incluyen las secuencias de los genes, así como su distribución, se ha podido establecer la divergencia entre los grupos de vertebrados, ya que, los cuerpos neuronales que contienen a la GnRH1 y a la GnRH2, están presentes en todos los grupos de vertebrados. La GnRH3, se presenta solo en los teleósteos, sugiriendo que la duplicación de este gen fue posterior al momento en que se separó la línea evolutiva que originó a los anfibios, por lo que pudiera decirse que es reciente. De hecho, varias investigaciones proponen que la duplicación de este genoma, ocurrió durante la transición de los cordados simples, como es el caso de los teleósteos, hacia el linaje del resto de los vertebrados (Hollan, *et al.*,1994; Lundin,1993; Ohno, 1993) (Figura 1).

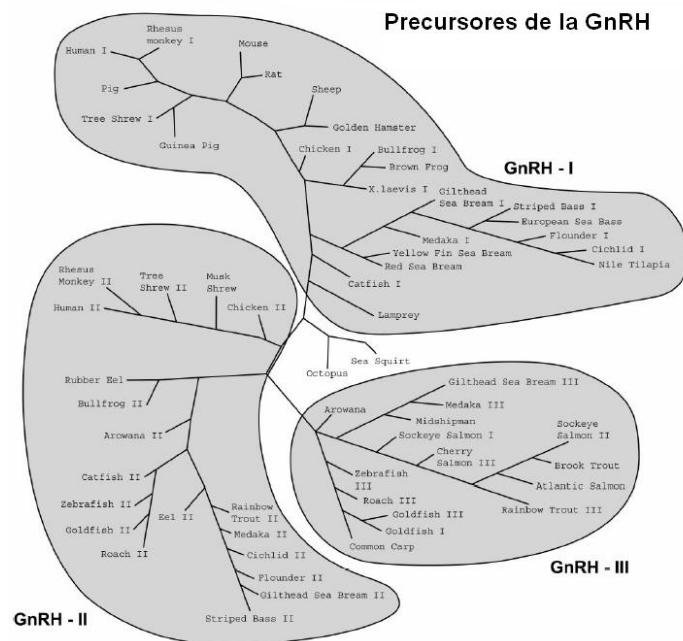


Fig. 1. Ramas filogenéticas, en donde se muestran las tres distintas ramas en donde se agrupan las distintas isoformas de la GnRH. Destacando que la agrupación para GnRH III, solo se presenta en especies de teleósteos (Modificado de Millar, 2004).

Capítulo III. Genes de la GnRH.

Todos los genes que codifican para la GnRH en los vertebrados, consisten de 4 exones separados por 3 intrones.

El primer exón codifica para el extremo 5' sin traducción (UTR). En el segundo, se encuentra el péptido señal (PS), el sitio de procesamiento (Gly-Lys-Arg), la secuencia de la GnRH y una parte de la secuencia del péptido asociado a la GnRH (GAP). El exón 3, contiene la parte media de la secuencia del GAP (27 aminoácidos para el gen de la sGnRH y 32 para el gen de la mGnRH y cGnRH-I). En el cuarto exón, se encuentra la última parte del GAP (9 aminoácidos para el gen de la sGnRH y 13 para el gen de la mGnRH) y la región del extremo 3' sin traducción. Además, posee un sitio de corte, el cual se caracteriza por tener dos pares de bases GT (donador) y una AG (aceptor), que se presenta en cada intrón (Kitahashi *et al.*, 2005) (Figura 2).

El gen de la GnRH, es un excelente ejemplo de la diversidad de regulación que se requiere para mantener la función evolutivamente conservada de este. Pero, para mantener la capacidad reproductiva, tanto del gen como su regulación, requiere de diversas señales, así como de neuromoduladores (Belsham & Lovejoy, 2005).

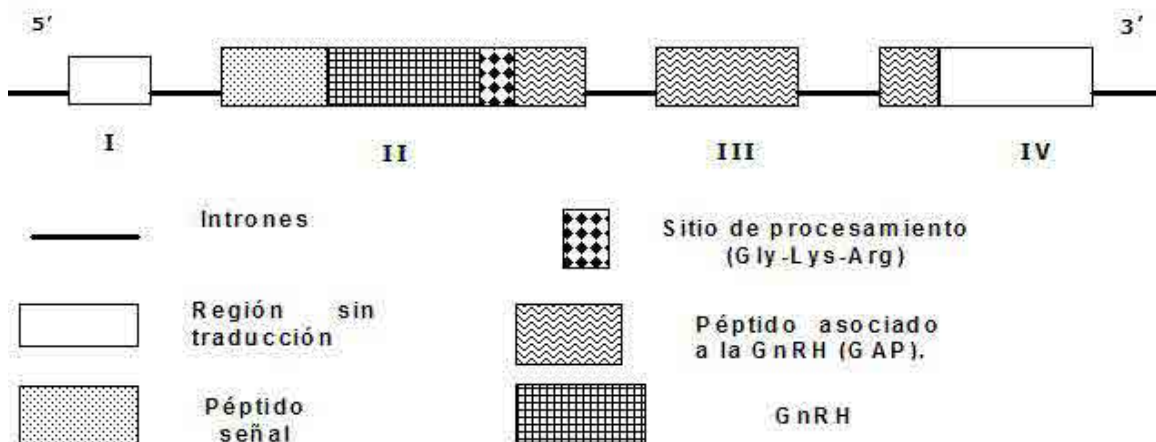


Fig. 2. Representación esquemática del gen que codifica para las distintas isoformas de GnRH.

Gen para la sGnRH.

En 1983, se aisló en encéfalos de hembras de salmón (*Onchorhynchus keta*), la primera molécula de la GnRH, para esta especie, a la cual se le asignó el nombre de sGnRH, de acuerdo a la nomenclatura convencional (Sherwood *et al.*, 1983). Estudios posteriores, han demostrado, que esta isoforma, está presente en un gran número de especies de teleósteos, además de que se ha reportado en algunas especies de reptiles y en una especie de mamífero, el capibara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) (Clarke & Pompolo, 2005; Carosfeld, 2000; Montaner *et al.*, 1999).

Ashihara, *et al.* (1995), obtuvieron para el caso de los salmónidos, la coexistencia de dos genes precursores para la sGnRH. Esto, se cree que se debió al resultado de la duplicación en su genoma, siendo este grupo de vertebrados de gran importancia, por presentarse como un buen modelo evolutivo (Ferriere, *et al.*, 2001).

Estos genes han sido localizados por técnicas como el Southern Blot e hibridación *in situ*, en varias especies de salmones y peces teleósteos, encontrando la existencia de ambos genes en varios de ellos (Leder *et al.*, 2004).

A estos dos genes se les han asignado los nombres de sGnRH-I y de sGnRH-II, respectivamente, los cuales son aproximadamente de 453 pb y de 481 pb, en el *Onchorynchus mikiss* y ambos son expresados en el cerebro (Ferriere, *et al.*, 2001).

En salmón, se tiene reportado que los genes para la sGnRH contienen una región río arriba que tiene una alta homología con su región codificante. En el salmón del Atlántico, se presenta una larga secuencia palindrómica de alrededor de 1200 pb, que probablemente participa en el control de la transcripción por la vía de receptores a estrógeno, y también, se encuentra en la región río arriba (Kungland, 1993). Al contrario, el gen para la sGnRH-I, tiene 3 distintos palindromes en la región río arriba (Higa *et al.*, 1997).

Ambos genes se expresan formando mRNAs en el cerebro y en las gónadas de varias especies de peces teleósteos. El gen de la sGnRH1 usa el sitio de inicio; sin embargo, el gen de la sGnRH2, usa dos sitios de inicio y un corte y empalme alternativo, produciendo

3 diferentes transcritos en las gónadas de trucha arcoiris y salmón. Estos se expresan indeterminadamente, durante los primeros dos años de vida (Gray *et al.*, 2002; von Schalburg *et al.*, 1999; Uzbekova, *et al.*, 2001).

Para caso del pez cebra (*Danio rerio*), se ha estudiado el gen que codifica para la sGnRH y está compuesto de 4 exones, los cuales son 20, 145, 75 y 93 pb, respectivamente, y 3 intrones, de 1129, 1509 y 94 pb (Figura 3).

Además, posee la típica estructura del gen para la sGnRH reportada para varias especies de peces teleósteos, que consta de la siguiente manera: El péptido señal (PS) (23 aminoácidos), el decapeptido de la GnRH, el sitio de procesamiento y el GAP (58 aminoácidos) (Gopinath *et al.*, 2004; Kuo, *et al.*, 2005).

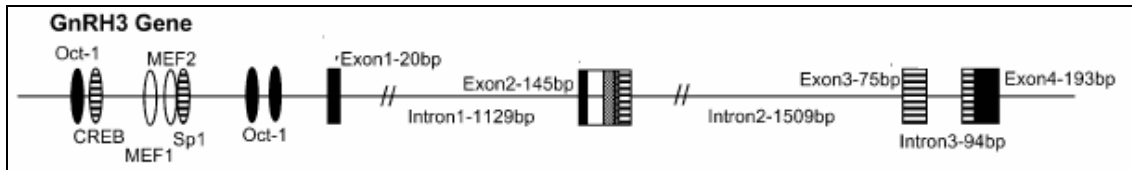


Fig. 3. Estructura del gen que codifica para la sGnRH en el pez cebra (*Danio rerio*) (Tomado de Kuo, *et al.*, 2005).

Promotor de la sGnRH.

Existen pocos estudios que se enfocan a la secuencia del promotor en los distintos genes para la GnRH, sin embargo, existen al menos tres especies de peces teleósteos en los que se ha podido identificar esta estructura.

Kitahashi *et al.*, (2005), clonaron y analizaron los promotores de los genes para las tres isoformas de GnRH (sGnRH, sbGnRH y cGnRH-II), en el *Astatotilapia burtoni*, encontrando que varias de las regiones en el promotor muestran una alta homología (67.6-90.0 %), con regiones que corresponden con el gen de la especie *Orizias latipes*.

La región promotora, para esta especie, contiene un marco abierto de lectura en las posiciones -2096 a la -4560 pb, la cual codifica para la proteína tirosina fosfatasa ϵ . Presentando sitios de unión para el retinoide X (RXR), el receptor a glucocorticoide (GR),

el receptor a la hormona tiroidea (TR) y Receptor al ácido retinoico (RAR). Además, presenta sitios de unión para factores de transcripción como c-jun, factores de transcripción miogénicos, como la miogenina y la MRF4, además de agrupaciones de c/EBP, sp-1, una caja GATA unida a la proteína 1 (GATA-1) y Oct-1. Además de esto, el transcrito de la proteína responsable del crecimiento temprano 1 (Egr-1) y el Factor esteroideogénico 1 (SF1), son fundamentales para el incremento de la expresión del gen promotor de la subunidad β de la LH, en las células gonadotropas, la cual es inducida a través de la GnRH, (Kaiser, *et al.*, 2000; Duan, *et al.*, 2002).

En el caso del pez cebra (*Danio rerio*) y el salmón (*Oncorhynchus masou*), el promotor del gen para la GnRH, contienen los factores de transcripción Oct-1 y Oct-6, ERE (elemento de respuesta a estrógenos), el receptor a glucocorticoide (GR), el receptor a progesterona (PR), la caja GATA-1, la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), SF-1 y una región OTX2 (Torgensen *et al.*, 2002).

Todas estas regiones, tienen distintas funciones en la regulación del gen para la GnRH, las cuales resultan de gran importancia para su expresión. Por ejemplo, se ha visto que, el CREB, en conjunto con los sitios Oct-1 y SP-1, son responsables de la expresión de la sGnRH (Husebye *et al.*, 1997).

Capítulo IV. Mensajeros de la GnRH.

Estructura de los cDNAs y mRNAs para la sGnRH.

El cDNA y el mRNA que codifican para las isoformas de la GnRH, han sido aislados en varias especies de vertebrados.

Para el caso de los peces teleósteos, son pocos los datos que se tienen; sin embargo, se sabe que en la mayoría de las especies, existen al menos dos isoformas que se expresan en el cerebro, y en algunas, se encuentra también una doble expresión en las gónadas y otros tejidos.

La organización del mensajero, para las isoformas de la GnRH, contiene las regiones 3' y 5' sin traducción, una secuencia que codifica para el precursor de la GnRH, el cual está compuesto por un péptido señal (PS), el decapeptido que codifica para la isoforma de la GnRH, el sitio de procesamiento y el GAP (Figura 4).

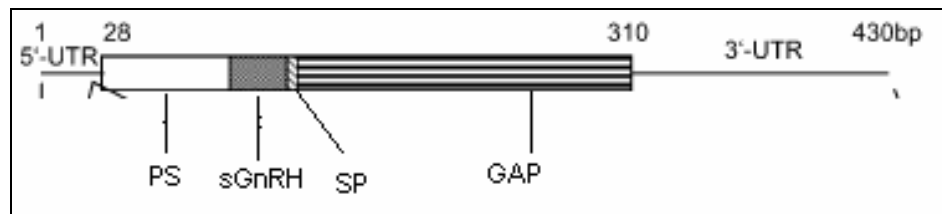


Fig. 4. Estructura del mRNA en donde se muestra su organización: Regiones 3' y 5' sin traducción (**UTR**), Péptido señal (**PS**), sitio de procesamiento (**SP**), péptido asociado a la GnRH (**GAP**) (Modificado de Kuo, *et al.*, 2005).

mRNA para la isoforma de la sGnRH.

Se conoce de la coexistencia de dos o tres isoformas de la GnRH que se expresan en el cerebro en una misma especie, además del mecanismo de activación y expresión de cada uno de los genes, así como sus mRNAs esto en la sGnRH es muy complejo (Vetillard *et al.*, 2006).

Ashihara *et al.*, (1995) encontraron en el cerebro de salmónidos, la existencia de dos diferentes genes precursores para la isoforma de la sGnRH. La explicación a ello, es que se presentó la duplicación del gen, durante la evolución de este y otros grupos de peces, hace aproximadamente 500 millones de años, siendo estos tetraploides. Ambo genes codifican para sus respectivos mRNAs y precursores y el deca péptido final, resulta ser el mismo. Dependiendo del gen precursor, son nombrados sGnRH mRNA 1 y sGnRH mRNA 2. En *Oncorhynchus nerka*, cuando son comparados los dos mRNAs, el mRNA 1, presenta varias deleciones.

En salmónidos, para la obtención de los dos tipos de mRNAs que se presentan, se utilizan distintas vías para el inicio de la transcripción y posterior corte y empalme. En el caso del mRNA 1, usa el sitio de inicio convencional y el procesamiento de corte y empalme. En la síntesis de mRNA 2, se comienza con un promotor río arriba y un corte y empalme alternativo. Para ambos mensajeros, ello se ha detectado tanto en el cerebro y en las gónadas.

Localización de mRNA de sGnRH en el cerebro.

Entre los trabajos realizados para establecer la localización de los mRNA de sGnRH destacan los realizados en *O. mykiss*, en la cual, por medio de Northern Blot, se encontró que el mRNA 1, se expresa en el área preóptica (POA) e hipotálamo; mientras que el mRNA 2, está presente en los bulbos olfativos (OB) y el telencéfalo (Ferriere *et al.*, 2001, Uzbekova *et al.*, 2000) (Figura 5).

En otro grupo de teleósteos como los ciprínidos, específicamente, en *Carassius auratus*, se han descrito también la presencia de dos isoformas de sGnRH. Al igual que para los salmónidos, la explicación para ello ha sido que los ciprínidos son tetraploides (Suetake *et al.*, 2000).

En el caso de especies como: *Pagrus major* (Okuzawa *et al*, 1994), *Porichthys notatus* (Grober *et al*, 1995), *Sparus aurata* (Gothilf, *et al*, 1996) y *Salmo salar* (Klungland *et al*, 1992), se ha localizado un solo tipo de mRNA, esto debido quizá, a que no se han tratado de localizar las dos isoformas, o que las especies en cuestión, como en la última especie, no sean tetraploides. Para *Pargus*, *Porichthys*, *Sparus* y *Salmo salar*, el mRNA de esta hormona es expresado en el hipotálamo y los bulbos olfativos.

Se ha encontrado la expresión, de los mRNAs para la sGnRH, en áreas del cerebro, además de encontrarse en el ovario y el testículo de vertebrados. En las gónadas poseen función parácrina, estimulando la esteroidogénesis (Andreu-Vieyra & Habibi *et al.*, 2001).

Se han hecho investigaciones demostrándose que con el avance de la gametogénesis, la expresión de los mRNAs de GnRH varían de acuerdo a la etapa en la que se encuentren.

En especies como el cíclido, *Astatotilapia burtoni*, la expresión de los mensajeros para la isoforma sGnRH, han sido detectados en el testículo.

En el pez dorado (*Carassius auratus*), el mRNA de la GnRH tiene una alta expresión en hembras que se encuentran en etapa de recrudescencia, madurez y estado postovulatorio (Lin & Peter, 1997).

En especies tetraploides en donde existen 2 distintos mRNAs, como es el caso de la trucha arcoiris, se ha encontrado que, en los machos el mRNA 2 se transcribe poco en los organismos inmaduros y se va incrementando conforme la espermatogénesis avanza y hasta el final de la misma. Se ha observado que la expresión del mRNA1 decrece dramáticamente al inicio de la espermatogénesis, en especial, cuando la espermatogonia se esta dividiendo (Uzbekova, *et al.*, 2001), y se vuelve a incrementar en las subsecuentes etapas hasta su término. Además, se cree que el incremento en la producción de andrógenos esta correlacionado con la expresión del mensajero observado durante la espermatogénesis, sugiriendo que este tiene un efecto positivo.

En esta misma especie, para el caso de las hembras, el mRNA 1 se expresa durante la ovogénesis, en especial, en las etapas finales del desarrollo de las gónadas y durante la primera puesta (Amano, 2003; Gray, *et al.*, 2002; Ferriere, *et al.*, 2001).

En sistemas donde coexisten tres isoformas de la GnRH, el mRNA, para la sGnRH, no se incrementa significativamente durante el proceso de maduración gonadal, en machos y hembras, sugiriendo que el mecanismo de expresión de este, no interviene de manera directa en la regulación de la expresión de los esteroides (Amano, *et al.*, 2004; Okuzawa *et al.*, 1997; Okuzawa, *et al.*, 2003).

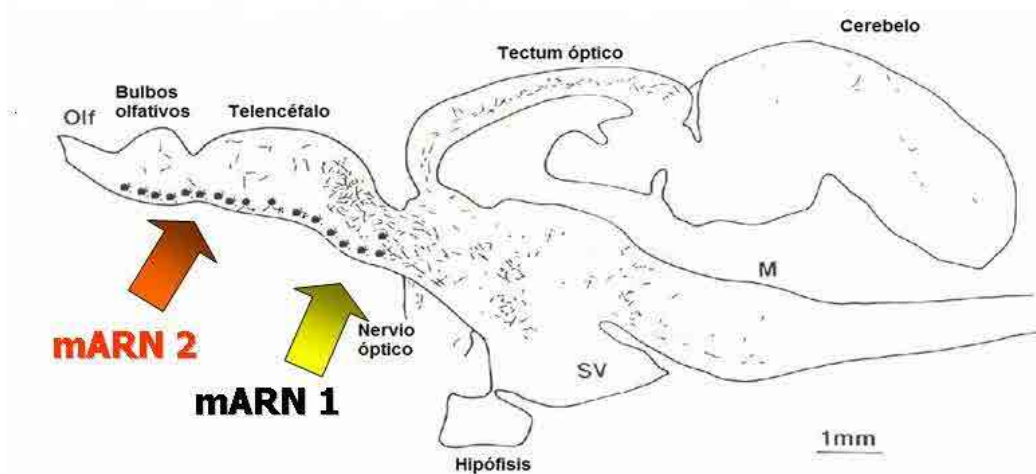


Fig. 5. Localización de los mRNAs para la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mikiss*). El mRNA1, se expresa en el área preóptica e hipotálamo. El mRNA2, en los Bulbos olfatorios y telencéfalo.

Expresión de los mRNAs, durante las primeras etapas de desarrollo.

Pocos son los estudios que se han realizado para determinar en que momento comienzan a expresarse los mRNAs para la GnRH. von Schalburg, *et al.*, (1999), encontraron que el mRNA 2, se expresa durante el desarrollo temprano en embriones y en recién eclosionados de salmón. Sin embargo, el mRNA 1 se expresa en momentos diferentes. Primero, esta presente durante la etapa embrionaria y después vuelve a expresarse cuando se empiezan a desarrollar las gónadas, tanto en hembras como en machos. Sugiriendo que los mRNAs, intervienen desde etapas muy tempranas del desarrollo y que estos se expresaran de acuerdo a la etapa en que se encuentren dentro de su historia de vida (Figura 6).

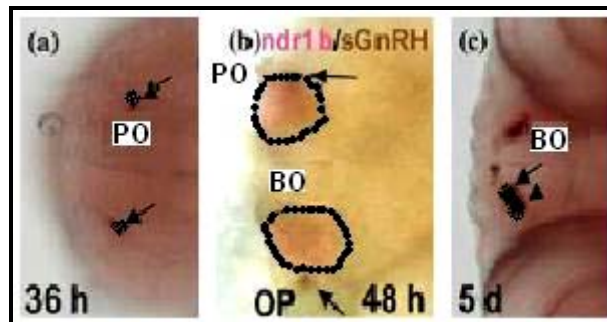


Fig.6. Expresión de sGnRH en embrión de pez cebra (*Danio rerio*), en distintas etapas de desarrollo (36, 48horas y 5 días) detectados por hibridación *in situ*. **(PO)** Placoda olfativa **(BO)** Bulbos olfativos (Modificado de Kuo *et al.*, 2005).

Capítulo V. Proteína de la GnRH.

Precursor de la isoforma de la sGnRH

La estructura de los precursores en la GnRH, para teleósteos, consiste principalmente de un péptido señal (PS), el decapeptido de la GnRH, el sitio de procesamiento y el GAP.

En los peces teleósteos, se tiene que la secuencia del péptido señal tiene aproximadamente de 20 a 25 aminoácidos. Conteniendo una región hidrofílica, que es requerida por la prehormona para que esta pueda ser secretada. Esta región, ha sido identificada para todos los precursores de la GnRH encontrados hasta la fecha, porque al inicio de su secuencia, contiene un aminoácido con carga positiva (Lys o Arg). Esta es altamente conservada en un gran número de especies, existiendo muy poca diferencia entre sus aminoácidos (Clarke & Pompolo, 2005).

En todos los precursores, hallados en todos los vertebrados, se encuentra el sitio de procesamiento (Gly-Lys-Arg), y es seguido del decapeptido de la GnRH, el cual es altamente conservado.

La diferencia fundamental en la estructura de los precursores para la GnRH, se encuentra en la parte del GAP. Este sirve de referencia para poder determinar la secuencia de las distintas isoformas. Siendo esta secuencia, de gran importancia en técnicas como la hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, para generar ribosondas más específicas y que estas tengan una menor homología en relación con las secuencias que codifican para los propios decapeptidos. Además, esta puede variar en el número total de aminoácidos, dependiendo de cada especie. Por ejemplo, el GAP del precursor para la cGnRH-II, en el pez dorado, bagre y mojarra, tiene aproximadamente 49 aminoácidos (Pandolfi *et al.*, 2005).

Para el precursor de la sGnRH, esta región es variable entre las distintas especies de peces teleósteos, ya que difiere entre 46 y 58 aminoácidos. En algunas especies de salmones, esta presenta 46 aminoácidos, 54, para el caso de ciclidos y lubina

(*Dicentrarchus labrax*) y 58, en el pez dorado (*Carassius auratus*) y el pez cebra (*Danio rerio*) (Lethimonier, et al., 2004; Torgensen et al., 2002).

La región del carboxilo terminal del GAP, en muchos precursores de la GnRH, consiste de un sitio de aminoácidos dibásicos (Lys-Arg, Arg-Arg, Lys-Lys, ó Arg-Lys), el cual típicamente representa un sitio de corte enzimático, para promover el procesamiento de las isoformas para la GnRH.

La función del GAP es poco conocida. Un papel que se le ha atribuido a este, es el de ser auxiliar en el plegamiento del péptido para facilitar posteriormente, los sitios de ruptura, contribuyendo de esta manera, a la maduración de la molécula (Cárdenas, 1997), participar en el correcto procesamiento y empacamiento del decapeptido (Schneider et al., 2006) y ayudar en una estructura secundaria adecuada para el procesamiento correcto del precursor de la GnRH (Sherwood & Wu, 2005; Sherwood, et al., 1994). Además, se sabe que, para el caso de los mamíferos, puede funcionar como un inhibidor de la liberación de la prolactina (Nicolics, et al., 1985; Weber et al., 1997) e inducir la dopamina (Gobert et al., 1992). En el caso de los teleósteos, está última es un inhibidor de la secreción de GtHs en algunas especies.

Analizando la estructura de la GnRH, se ha demostrado que, tras la ruptura del péptido señal, el residuo del ácido glutámico del amino terminal de la molécula, se convierte en ácido piroglutámico. Entonces, la hormona se separa del GAP, al separarse de los aminoácidos del sitio de procesamiento (Lys-Arg), por la acción de endopeptidasas. El grupo del carboxilo terminal de la molécula, tiene una modificación por la α peptidil-glicina monooxigenasa, que amida a dicho grupo, el cual, ya es activo. Después el GAP y la GnRH, son almacenados en los gránulos de secreción, hasta que son liberados (Wetsel et al., 1991).

Capítulo VI. Origen de la sGnRH.

Varios estudios han localizado la distribución de los péptidos de las distintas isoformas de la GnRH en el cerebro. Sin embargo, aún no se sabe del todo, como y en que momento las neuronas expresan a dicha hormona durante el desarrollo de cada especie (Wierman, 2004).

El origen y la migración de las neuronas positivas a la GnRH, han sido ampliamente estudiadas en mamíferos como ratones y humanos, por lo que en este grupo de vertebrados, se tiene un panorama más amplio. Para el caso de los teleósteos, este conocimiento es muy escaso, contando con pocas investigaciones (Tobet, 2006; Whitlock, 2005; Schawanzel-Fukuda & Paff, 1989).

El origen de las neuronas que expresan a la GnRH-1 en el ratón, fue descrita en 1989, por Wray, Schawanzel-Fukuda y Pfaff, quienes demostraron de forma independiente, que las poblaciones de las neuronas productoras de GnRH que regulan el eje reproductivo se originan en células que dan lugar a los tejidos del olfato (Wray, *et al.*, 1989; Schawanzel-Fukuda & Paff, 1989).

Después, Muske (1993), propuso la existencia de dos mecanismos que pueden explicar el origen y distribución de las isoformas presentes en una misma especie. El primero, denominado Sistema Nervio Terminal-Septo Preóptico y el segundo, el sistema de la cGnRH-II o del cerebro medio. Las células del primer sistema, tiene su origen embrionario en la placoda olfativa y aquí es expresada alguna isoforma de la GnRH de acuerdo a la especie, por ejemplo, mGnRH, para el caso de muchos mamíferos, cGnRH-I, en aves, sGnRH, en salmónidos entre otros (Sherwood *et al.*, 1997). Este sistema está compuesto por la extensión de cuerpos celulares nerviosos y se extienden hacia las proximidades del nervio terminal (TN) y al hipotálamo anterior, a través del área septal. Las neuronas de GnRH aisladas, han sido encontradas, en el bulbo olfativo a lo largo del TN en el *Dicentrarchus labrax* (González-Martínez *et al.*, 2001) y en el hipocampo de mamíferos (Dellovade *et al.*, 1993). El siguiente sistema para el caso de todos los gnatostomados, es representado por un grupo de neuronas localizadas en el diencéfalo posterior y la parte rostral del mesencéfalo. Estas neuronas presentan la isoforma de cGnRH-II y por lo

menos en teleósteos, se sabe que se originan en la zona germinal del tercer ventrículo (González-Martínez *et al.*, 2002). La función fisiológica de cGnRH-II es aún desconocida. A través de técnicas bioquímicas, inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, se ha determinado la diferente distribución de la sGnRH en el cerebro (González-Martínez, 2001) en varios teleósteos, como el *Oncorhynchus nerka* (Parhar, *et al.*, 1995), *Oncorhynchus keta* (Chiba, *et al.*, 1994), *Oncorhynchus masou* (Amano, *et al.*, 1998), *Oryzias latipes* (Parhar, *et al.*, 1998), *Haplochromis burtoni* (White & Fernald, 1998), *Oreochromis niloticus* (Parhar, 1999), *Pagrus major* (Okuzawa, *et al.*, 2002), *Dicentrarchus labrax* (González-Martínez, *et al.*, 2002), *Cichlasoma dimerus* (Pandolfi *et al.*, 2002) y el *Verasper moseri* (Amano, *et al.*, 2004). Estas especies tienen en común, el mismo patrón de distribución, encontrándose principalmente en el Nervio Terminal (TN) y en el área preóptica, sugiriendo que cada una de estas áreas tienen un diferente origen embrionario (Biju, *et al.*, 2005; Okubo *et al.*, 2006; Pandolfi, *et al.*, 2002; Tobet, *et al.*, 2001).

El origen del grupo de células de GnRH-ir, localizadas en el área preóptica (POA), es aún investigado. Parhar sugiere que este grupo celular se deriva de la pared del diencefalo ventricular (Parhar, 1997; Parhar *et al.* 1998). Sin embargo, González-Martínez *et al.*, (2002), propone que este grupo celular, se origina de la placoda olfativa, al igual que el grupo neuronal que origina a todas las isoformas de la GnRH que se encuentra en el nervio terminal.

sGnRH en el nervio terminal: Origen y expresión.

Con base en los amplios estudios acerca del origen de sGnRH en el TN como una primera zona de aparición de dicha hormona, dichos trabajos se han tomado como modelo para ofrecer una explicación de la aparición de la isoforma.

Las neuronas que están presentes a lo largo del nervio terminal, algunas veces forman grupos celulares llamados “ganglio terminal” o ganglio del nervio terminal (TNG). Se ha descubierto, que dichas neuronas se proyectan hacia la retina en teleósteos. Debido a la proyección hacia esta y las estrechas relaciones topográficas con el sistema olfativo, el TNG ha sido llamado núcleo olfatoretinalis. Se ha sugerido que, las neuronas del nervio terminal detectan feromonas a través de procesos directos hacia el epitelio olfativo, y

median la información en el telencéfalo ventral para facilitar el comportamiento reproductivo.

Para entender como las neuronas expresan a la sGnRH en el TN, se han realizado investigaciones durante el desarrollo ontogénico de teleósteos. La hormona se detecta por primera vez en la placoda olfativa de los vertebrados, una estructura que surge de la placa neural anterior cuando el tubo neural se está formando (Whitlock, *et al.*, 2003; Whitlock *et al.*, 2006; Whitlock & Weterfield, 2003), en donde aparecerán los órganos del olfato, a consecuencia de la interacción de la placoda olfativa y las cresta neural. La placoda, eventualmente dará lugar eventualmente a las estructuras sensoriales, tales como las células del pelo, del oído interno y las neuronas de la nariz, así como la lente del ojo (pero no a las células del ganglio retinal), así como a la adenohipófisis (Baker & Bronner-Fraser, 2001; Whitlock, 2004). Las células formadas de esta área, migran lejos para poblar regiones del telencéfalo ventral, incluido el TN y el hipotálamo (Dubois, *et al.*, 2002; Parhar, *et al.*, 1998; Fernald & White, 1999; Schwatz & Levine, 2006.).

Capítulo VII. Distribución de las isoformas de la GnRH.

Diversas técnicas como lo son: el radioinmunoensayo (RIA), inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y HPLC, han sido utilizadas para establecer la distribución de la hormona en cuestión. Estas técnicas han sido aplicadas principalmente en el cerebro e hipófisis en un gran número de especies de teleósteos, encontrando que dos o tres isoformas están en ambas estructuras. Cabe destacar que están presentes 3 isoformas, en la familia de los perciformes o “peces modernos” (Tabla 2). En los peces teleósteos, la distribución de la GnRH se ha dividido en tres diferentes sistemas en el cerebro.

El primero, se distribuye a lo largo de la porción ventral del cerebro anterior, en donde están incluidos el telencéfalo ventral, el área preóptica (POA) y el hipotálamo y se le nombró, sistema VF-GnRH.

El segundo, engloba otras áreas del diencefalo y mesencefalo o cerebro medio (MB-GnRH) y por ultimo, el distribuido en el nervio terminal, el TN-GnRH (Dubois, *et al.*, 2002).

En varias especies de teleósteos, el VF-GnRH presenta un gran número de isoformas tales como: sGnRH, mGnRH, cfGnRH, sbGnRH, mdGnRH o pjGnRH, hrGnRH (Lethimonier, *et al.*, 2004). De neuronas que poseen la hormona surgen axones hacia la hipófisis (Yamamoto *et al.*, 1998; González-Martínez *et al.*, 2001).

En MB-GnRH se detecta la isoforma más conservada, cGnRH-II, la cual, se encuentra en todos los vertebrados (Rodríguez-Gómez *et al.*, 1999; Somoza, *et al.*, 2002, Okubo, *et al.*, 2001; Soga, *et al.*, 1998; Yamamoto, *et al.*, 1995; Powell, *et al.*, 1994).

Hasta la fecha, para TN-GnRH en varias especies de teleósteos, solo se ha detectado la sGnRH (Zandbergen, *et al.*, 1995). Una recopilación de los datos anteriores se muestra en la Tabla 2.

	Telencéfalo (Tel)	Área preóptica (POA)	Mesencéfalo (MT)	Referencias
Anguiliformes <i>Anguilla anguilla.</i>	mGnRH	mGnRH	cGnRH-II	Montero, <i>et al.</i> (1994).
Pantodonides <i>Pantodon buchholzi.</i>	mGnRH	mGnRH	cGnRH-II	O' Neill <i>et al.</i> (1998).
Osteoglosiformes <i>Scleropages jardin.</i>	sGnRH	sGnRH	cGnRH-II	Okubo, <i>et al.</i> (2001)
Cupleiformes <i>Clupea harengus.</i>	sGnRH	hgGnRH	cGnRH-II	Carosfeld <i>et al.</i> (2000).
Cipriniformes <i>Carassius auratus.</i> <i>Danio rerio.</i> <i>Gnathopogon caeruleus</i> <i>Rutilus rutilus</i>	sGnRH	sGnRH	cGnRH-II	Yu, <i>et al.</i> (1998) Powell, <i>et al.</i> (1996). Okuzawa <i>et al.</i> , (1994). Penligton, <i>et al.</i> , (1997).
Siluriformes <i>Clarias gariepinus.</i>	cfGnRH	cfGnRH	cGnRH-II	Zandbergen <i>et al.</i> (1995).
Caraciformes <i>Piaractus mesopotamicus.</i>	sGnRH	sbGnRH	cGnRH-II	Powell, <i>et al.</i> (1997).
Salmoniformes <i>Coreogonus clupeaformis.</i> <i>Oncorhynchus mykiss.</i> <i>Oncorhynchus masou.</i> <i>Oncorhynchus nerka.</i>	sGnRH sGnRH	wfGnRH sGnRH	cGnRH-II cGnRH-II	Adams, <i>et al</i> (2002). Okuzawa, <i>et al.</i> (1990). Amano, <i>et al.</i> (1991). Parhar, <i>et al.</i> (1995)
Atheriniformes <i>Odontheistes bonariensis.</i>	sGnRH	pjGnRH	cGnRH-II	Montaner <i>et al.</i> (2001).
Sinbranciformes <i>Symbranchus marmoratus.</i>	sGnRH	pjGnRH	cGnRH-II	Somoza <i>et al.</i> (2002).
Beloniformes <i>Oryzias latipes.</i>	sGnRH	pjGnRH	cGnRH-II	Okubo <i>et al</i> (2000).
Ciprinodontiformes <i>Xiphophorus maculatus.</i>	sGnRH	pjGnRH	cGnRH-II	Somoza, <i>et al.</i> (2002).
Escorpaeniformes <i>Sebastes rastrelliger.</i>	sGnRH	sbGnRH	cGnRH-II	Powell, <i>et al.</i> (1996); Collins, <i>et al.</i> , (2001).

Perciformes <i>Cichlasoma dimerus.</i> <i>Haplocromis burtoni.</i> <i>Oreochromis niloticus</i> <i>Sparus aurata.</i> <i>Morone saxatilis.</i> <i>Dicentrarchus labrax.</i> <i>Pagrus major.</i> <i>Oreochromis mossambicus.</i> <i>Acanthopagrus schlegeli.</i> <i>Opleganthus fasciatus.</i>	sGnRH	sbGnRH	cGnRH-II	Pandolfi, <i>et al.</i> , (2002) White, <i>et al.</i> , (1995). Parhar, <i>et al.</i> , (1998). Gothilf, <i>et al.</i> , (1996). Chow <i>et al.</i> , (1998). González-Martínez, <i>et al.</i> , (2001). Senthilkumaran, <i>et al.</i> , (1999). Senthilkumaran, <i>et al.</i> , (1999). Senthilkumaran, <i>et al.</i> , (1999).
Pleuronectiformes <i>Verasper moseri.</i> <i>Scophthalmus maximus.</i>	sGnRH	sbGnRH	cGnRH-II	Amano, <i>et al.</i> (2002). Anderson, <i>et al.</i> (2001).
Tetraodontiformes <i>Fugu rubripres</i>	sGnRH	sbGnRH?	cGnRH-II	Aparicio, <i>et al.</i> (2002)
Escianidae <i>Micropogonias undulatus.</i> <i>Sciaenops ocellatus</i>	sGnRH	sbGnRH	cGnRH-II	Mohamed, <i>et al.</i> (2005). Mohamed & Khan (2006).
Centropomidae <i>Lates niloticus</i> <i>Centropomus undecimalis.</i>	mGnRH sGnRH	mGnRH sbGnRH	cGnRH-II	Mousa & Mousa (2003). Sherwood <i>et al.</i> , (1993).
Poecilidae <i>Xiphophorus helleir</i> <i>Xiphophorus maculatus</i>	sGnRH	pjGnRH	cGnRH-II	Somoza, <i>et al.</i> , (2002).
Lepidosirenidae <i>Lepidosiren paradoxa</i>	mGnRH	mGnRH	cGnRH-II	Cassarà, <i>et al.</i> , (2001).

Tabla 2. Distribución de las isoformas de GnRH en el cerebro de peces teleósteos (Modificado de Somoza *et al.*, 2002)

Para especies como el *Carassius auratus*, *Onchorynchus masou*, *Scleropages jardini*, *Danio rerio*, *Rutilus rutilus* y *Onchorynchus mikiss*, se ha localizado la presencia de dos isoformas, la sGnRH y cGnRH-II. El patrón básico de distribución de la primera, se encuentra a lo largo de la porción ventral del cerebro anterior (nervio terminal, telencéfalo ventral, área preóptica e hipotálamo), y la segunda en la transición entre el diencefalo y el mesencefalo (sinencefalo) (Kah *et al.*, 1991). Además de lugares tales como nervios que se encuentran en el olfato, en los bulbos olfatorios, el nervio Terminal, incluso se ha demostrado que esta hormona se presenta en la hipófisis a través de extensiones axonales, sugiriendo que puede actuar como un neuromodulador.

La sGnRH, se localiza principalmente en los nervios que se encuentran en el olfato, en los bulbos olfatorios, el nervio terminal, el telencéfalo ventral y el área preóptica. Además, se ha demostrado que la existencia de esta isoforma presenta extensiones axonales hacia la hipófisis (Amano, *et al.*, 1991; Kim, *et al.*, 1995).

La isoforma de la cGnRH-II, se distribuye en la región media del encéfalo (Okubo, *et al.*, 2000; Soga, *et al.*, 1998; Yamamoto, 2003).

La diferente distribución de las células y fibras con isoformas específicas sugiere la existencia de las diferentes funciones (Figura 7).

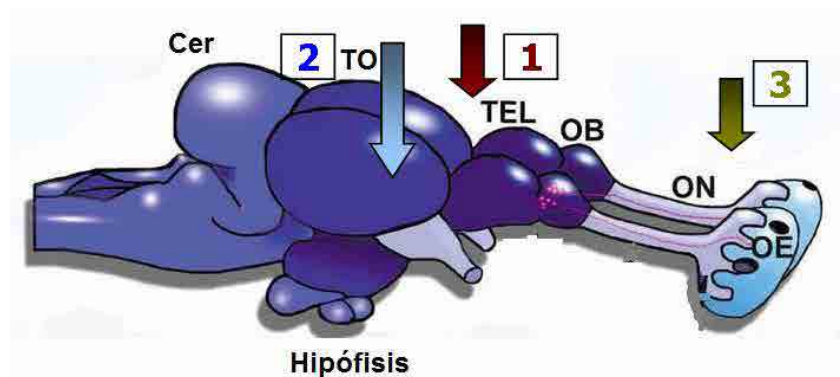


Fig. 7. Representación esquemática del cerebro de Dwarf gourami (*Colisa lalia*), en donde se muestran los tres sistemas de la GnRH, indicadas con flechas. En donde se localizan: el epitelio olfativo (OE), el Nervio Terminal (TN), el nervio olfativo (ON), los bulbos olfatorios (OB), Telencéfalo (TEL), Tectum óptico (TO) (Modificado de Wirsig-Wiechmann & Oka, 2002).

Capítulo VIII. Función de la isoforma sGnRH, de acuerdo con su localización en el encéfalo.

Se sabe que el papel fisiológico específico de cada isoforma de la GnRH aún no es del todo claramente entendida, pero se cree que las principales funciones, dependiendo de su localización en el cerebro, están relacionadas con la reproducción y el comportamiento social, siendo para ello, el cíclido *Haplochorimis burtoni*, el *Thalassoma bifasciatum* y dos gobidos, el *Zosteisessor ophiocephalus* y el *Gobius Níger*, los más estudiados hasta la fecha (Burmeister *et al.*, 2005; Scaggiante, 2006).

De acuerdo con la localización de la sGnRH, reportada para varias especies de vertebrados, en especial, para el caso de los teleósteos, se han establecido diferentes funciones para esta isoforma.

Como se asignó originalmente, cuando sGnRH se encuentra en VF, su papel es clave en el control de la reproducción de todos los vertebrados. Sus funciones son muy diversas, actuando como una hormona neuroendocrina en la liberación de las gonadotropinas, también con un papel autocrino, en las neuronas que expresan la GnRH y como neurotransmisor y neuromodulador. Además de tener una función parácrina, siendo esencial para la gametogénesis y esteroidogénesis en las gónadas, ejercida a través de la regulación de la síntesis y la liberación de gonadotropinas en la hipófisis, desde los peces hasta los humanos (Ishizaki *et al.*, 2004; Millar, 2004; Seaflon *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1997; Givens *et al.*, 2004; Amano *et al.*, 1995; Yamada, *et al.*, 2002; Whitlock *et al.*, 2003).

En el pez dorado (*Carassius auratus*), se ha demostrado que esta distribución es esencial para el desarrollo del ovario y la ovulación (Lim, *et al.*, 2001). Además, se ha sugerido que la principal función de la GnRH en esta área, sea la de coordinar la entrada de estímulos olfativos y de la visión para el proceso reproductivo (Kudo, *et al.*, 1996).

Por otro lado, se ha postulado que las neuronas que expresan a la sGnRH, en el área preóptica (POA), participan en el comportamiento social y reproductivo en el cíclido *Astatotilapia burtoni* (Fernald, 2002, Greenwood & Fernald, 2004; Ogawa *et al.*, 2006).

Si esta isoforma se expresa en las neuronas en el ganglio del nervio terminal (TNG), su función es diferente, presentando un papel fundamentalmente como neuromodulador. Los axones de las neuronas de esta zona, se extienden ampliamente dentro del cerebro pero no llegan hasta la hipófisis (Oka, 1992). Otra atribución de la función sGnRH en esta región es, los cambios en el comportamiento animal, por ejemplo, en los estados de motivación y estimulación (Abe & Oka, 2002).

Recientemente, en mamíferos, se han localizado la existencia de dos isoformas más. Una de ellas es denominada GnRH-II, con una secuencia similar a la isoforma conservada de la cGnRH-II. La otra denominada GnRH-III, teniendo homología con la sGnRH, presente en teleósteos. Esta última, fue extraída del cerebro de bovino y de humano. En dichos trabajos se ha sugiriendo que las funciones de estas dos isoformas participan en la inducción de la secreción de las gonadotropinas y el comportamiento sexual (Turkstra *et al.*, 2005).

Capítulo IX. Receptores y señales de transducción a la GnRH.

Los eventos principales que la GnRH promueve en la hipófisis anterior son: la síntesis y liberación de las gonadotropinas, y están mediados por los receptores específicos a la GnRH (GnRH-Rs), por ello, los conocimientos que se adquieran, tanto de su estructura y como de su regulación son esenciales para entender los mecanismos de la fisiología de la reproducción (Guilgur, *et al.*, 2006).

La clonación molecular de los receptores para la GnRH han acelerado el progreso en los estudios de la actividad estructural del complejo receptor-ligando (Millar, 2004; Seafon, *et al.*, 1997).

A mediados de 1980, se sugirió que el receptor de la GnRH, estaba ligado con el mecanismo de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Después, ya para 1992, con la clonación del cDNA para receptores en varias especies y la deducción de secuencias de aminoácidos, confirmarían que el receptor de la GnRH, posee la típica estructura característica de esta superfamilia (Dobkin-Bekman *et al.*, 2006; Khdra & Li, 2006; Ramakrishappa *et al.*, 2005).

Dentro de los GPCR, los GnRH-Rs son miembros de la gran superfamilia de la rodopsina. Estos receptores, cuentan con tres dominios funcionales: un amino terminal extracelular, con una cantidad de 30-40 residuos de aminoácidos y algunos de ellos pueden estar glicosilados; 7 dominios transmembranales (TMs) con hélices α (280-290 aminoácidos), la cual es característica de esta superfamilia. Sin embargo, en mamíferos, la diferencia es la ausencia del carboxilo terminal del tallo citoplasmático, el cual es el encargado de la desensibilización o el reciclaje de los receptores e internalización de los GPCRs. Los TMs están unidos por 3 asas extracelulares (EL) y 3 asas intracelulares (IL), importantes para la unión del ligando y señales de transducción, respectivamente, y el Carboxilo terminal citoplasmático que puede estar palmitolado. Su función es mediar los efectos de unión, propagación de señales, la desensibilización o el reciclaje, provocada por la exposición prolongada a la GnRH o sus agonistas e internalización del receptor

(Lehimonier, *et al.*, 2004; McArdle, *et al.*, 2002; Millar *et al.*, 2004; Moncaut, *et al.*, 2005; Pawson & McNeilly, 2005;) (Figura 8).

En muchos GPCRs, la región del tallo citoplasmático, se ha visto que juega un papel determinante en la regulación de las señales del receptor, la desensibilización y el tráfico intracelular (Ferguson, 2001). Además de acoplarse a la proteína Gq/11, Algunos estudios han presentado que otras variantes de la proteínas G, como la Gq/11, Gs y la proteína Gi pueden mediar las acciones de los receptores a la GnRH. El asa intracelular y el tallo del carboxilo terminal, han sido incluidos en el acoplamiento de los GPCRs a las proteínas G. Varios estudios han mostrado que el receptor a la GnRH es capaz de unirse a varias proteínas G, activando un número de efectores (Millar, 2004; Millar & Pawson, 2004), a través de diferentes elementos de las tres asas intracelulares, parece ser que se une a la proteína Gq/11, por medio de las asas intracelulares 2 y 3, mientras que la proteína Gs, se une al asa intracelular 1. En ciertos tejidos, se ha sugerido que el receptor a la GnRH, se une a la proteína Gi, no obstante, no se han estudiado las asas intracelulares involucradas a este respecto.

El tallo del carboxilo terminal de las GPCRs, ha sido incluido en la regulación de las señales por la vía del receptor acoplado a las proteínas G. Muchos estudios han establecido la importancia de esta región en el acoplamiento, desensibilización e internalización de los receptores a la GnRH.

A través del acoplamiento con la proteína Gq/11 y la activación de la PKC, el receptor a la GnRH puede inducir la activación de las 4 subfamilias de la MAPK, las cuales contienen a la ERK, la c-jun-N-terminal proteincinasa (JNK) y la p38MAPK y la gran MAPK (BMK) (Bonfil, *et al.*, 2004; Bernard, *et al.*, 2001). Se sabe que la ERK es una secuencia exportadora no nuclear, que se encuentra dentro del núcleo, que desfosforila, posibilitando la reasociación junto a MEK (la cual no tiene una secuencia exportadora nuclear) y en consecuencia cambian la translocación del citoplasma al núcleo de las células (Caunt *et al.*, 2006; Krens *et al.*, 2006). Todas estas han sido objeto de recientes investigaciones. En donde se sabe que estas desempeñan un papel en la regulación de la expresión de los genes para las distintas subunidades de las gonadotropinas (Naor, *et al.*, 2000). En esta ruta, el calcio tiene un papel importante (Gur *et al.*, 2001; Naor, *et al.*, 1998). (Kraus, *et al.*, 2001) (Fig. 9).

En la línea celular LβT2 se ha demostrado que la activación de la ERK induce a c-fos y a la expresión del gen de la LHβ y el proceso de señalización ocurren por la activación del receptor a la GnRH a través de la vía de las proteínas Gq/11 y Gs (Pawson & McNeilly, 2005; Harris *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002).

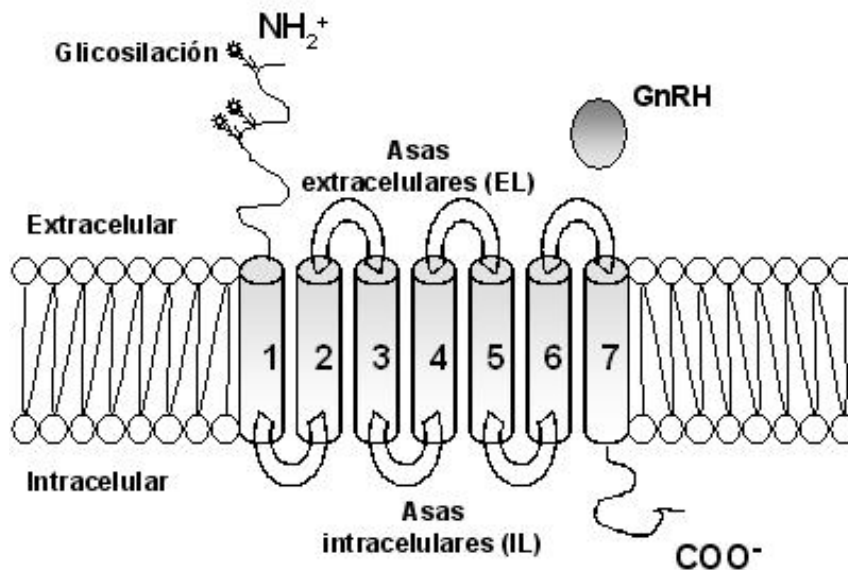


Fig. 8. Estructura general del Receptor a la GnRH. En donde se muestra el extremo amino extracelular, los 7 dominios transmembranales (TMs), conectados por 3 asas intra y extracelulares (IL y EL, respectivamente) y un extremo carboxilo intracelular.

En 1992, el cDNA que codifica para el GnRH-R, fue descrito en el ratón (Tsutsumi, *et al.*, 1992; Reinhart, *et al.*, 1992) y se le asignó el nombre de GnRH RI. Con su aislamiento, secuencias homologas fueron identificadas en diferentes especies de vertebrados.

En el pez gato africano, fue descrito el primer receptor para los peces teleósteos (Tensen, *et al.*, 1997). Desde entonces, cDNAs que codifican para este, han sido descritos para varias especies. Debido a la presencia de diferentes isoformas encontradas, se sugiere la existencia de más de uno en varias especies de vertebrados. De hecho, en estos últimos años, se ha descrito la presencia de más de un subtipo son expresados en una sola especie (Shimizu & Bédécarrats, 2006).

Con la existencia de las isoformas de la GnRH, se creyó que cada receptor correspondía exclusivamente a un ligando específico. Sin embargo, en algunas especies de peces, los receptores responden a más de una isoforma de la GnRH (Blomenrhör, *et al.*, 2002).

Con los datos obtenidos a partir de la clonación de varios receptores para la GnRH, se ha sugerido que hubo una evolución temprana de estos subtipos en vertebrados, lo cual se cree que sucedió en paralelo con los distintos ligandos que se han reportado hasta la fecha (Millar, 2003; Millar, 2004; Millar, 2005).

Se han encontrado tres diferentes receptores en especies como: *Oryzias latipes* (Okubo, *et al.*, 2003; Okubo, *et al.*, 2001), *Oreochromis niloticus* (Soga, *et al.*, 2005); dos en: *Danio rerio* (Troskie, *et al.*, 1998), *Carassius auratus* (Illing, 1999), *Clarias gariepinus* (Bogerd, *et al.*, 2002), *Onchorynchus mikiss* (Madigou, *et al.*, 2002), *Morone saxatilis* (Alok, *et al.*, 2000), en *Astatotilapia burtoni* (Robinson, *et al.*, 2001); y cinco en: *Dicentrarchus labrax* (Moncaut, *et al.*, 2005), *Tetraodon nigroviridis* (Ikemoto & Park, 2005) y en *Oncorhynchus masou* (Jodo, *et al.*, 2003).

De acuerdo a sus secuencias se ha elaborado el análisis filogenético de estas, indicando que los receptores pueden ser agrupados en tres clases distintas, designados como: GnRH-R1, GnRH-R2 y GnRH-R3 o receptores del tipo I, II y III (Millar, 2005; Millar, 2004). El receptor de tipo I (GnRH-R-I), se encuentra en los mamíferos, anfibios y peces; los del tipo II (GnRH-R-II), en anfibios y humanos y por último los del tipo III (GnRH-R-III), agrupan solo a los teleósteos, principalmente a la familia de los perciformes (Lehavi-Sivan *et al.*, 2006).

Los receptores del tipo I y II, muestran un agrupamiento muy extenso. El hecho de que, los receptores del tipo I se encuentren en todas las clases de vertebrados, indica que este receptor es antiguo, y se postula que pudo ser el primero, para luego poder separarse. Los receptores del tipo III, solo incluyen a los peces, en especial, a los perciformes y algunas especies de anfibios, por lo que se puede sugerir que la evolución a lo largo del linaje de los teleósteos, ha sido completamente aislada de otras clases de vertebrados (Morgan & Millar, 2004). Comparando las secuencias del III, están más relacionados con las del tipo II, que con las del tipo I, postulándose que la relación entre los tipos II y III de

receptores surgieron de la duplicación de un gen antiguo en los vertebrados inferiores (Lehavi-Sivan *et al.*, 2006; Lehavi-Sivan & Avitan, 2005; Millar, 2004) (Figura 9).

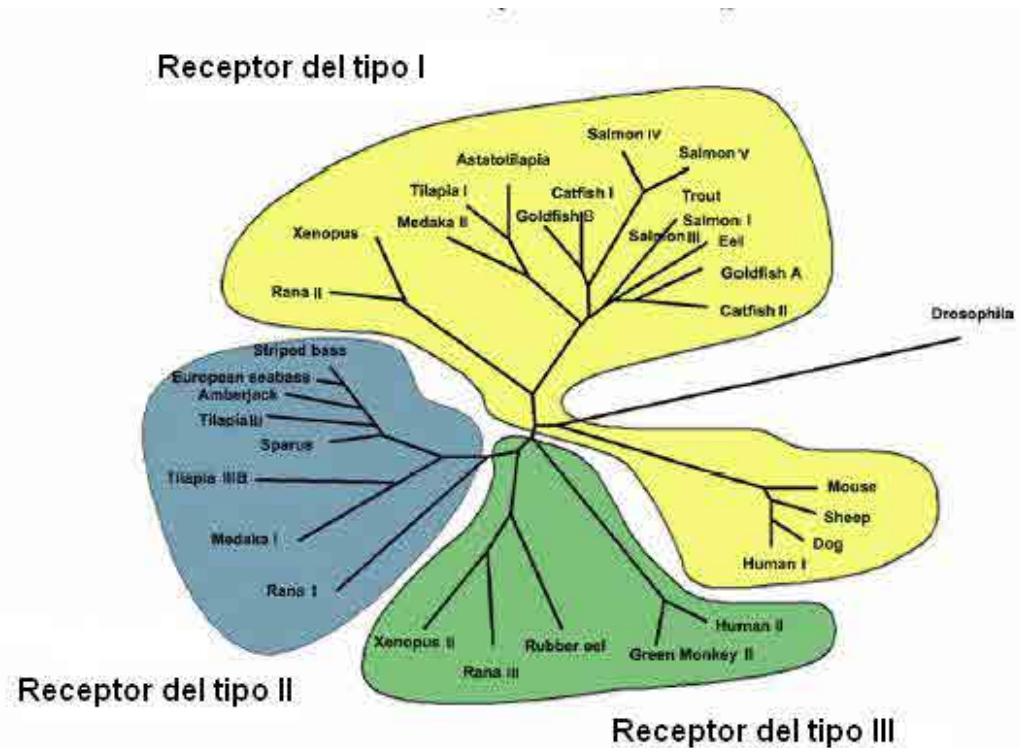


Fig. 9. Árbol filogenético en donde se muestran los tres tipos de receptores para la GnRH (Modificado de Lehavi-Sivan *et al.*, 2005).

Estudios como el de Troskie, *et al.*, (1998), en donde se analizaron las relaciones filogenéticas del dominio extracelular 3 (EC3) del receptor para la GnRH, se ha propuesto que todos los receptores pueden ser agrupados en dos tipos: los del tipo I, conteniendo a los subtipos IA y IB, que incluyen a todos los grupos de vertebrados. Los del tipo II, agrupan a los receptores que se presentan sólo en tetrápodos. Esta propuesta está basada en varios criterios, como la organización del gen, la existencia del carboxilo terminal en este dominio y los tres clados filogenéticos para los tres diferentes tipos de ligandos. Estos dos grandes agrupamientos se han utilizado con la finalidad de que, al irse descubriendo nuevos tipos de receptores, en las distintas especies de vertebrados, no resulten ser un problema, procurando que todos los receptores que puedan ser identificados en todos los vertebrados se ubiquen dentro de esta propuesta (Millar, 2004).

La clasificación de los distintos receptores para la GnRH entre especies puede ser confusa, ya que a los genes se les ha asignado nombres de acuerdo a la cronología y a la derivación de la secuencia. Sin embargo, no se ha tomado en cuenta la escala filogenética, las características farmacológicas o sus funciones (Millar, *et al.*, 2004). Hasta la fecha, la nomenclatura ha sido inconsistente.

Secuencia de los receptores para la GnRH, en teleósteos.

La organización genómica para los receptores en peces teleósteos, ha sido descrito en el *Oryzias latipes* (Okubo, *et al.*, 2001) y en *Onchorhynchus mikiss* (Madigou, *et al.*, 2002). Estos presentan dos tipos de receptores.

Los genes que codifican para los receptores del tipo I, consisten de tres exones separados por dos intrones. Este contiene a la región 5', con la presencia de las cajas TATA y CAAT, esta estructura se ha conservado en el receptor del tipo II, en humano (Neill, 2002). En general, la estructura del gen para el receptor del tipo II, es más compleja. En el caso las dos especies de peces teleósteos mencionadas anteriormente, usan un promotor alternativo y un corte y empalme, que produce la estructura del gen se compone de tres o cuatro exones (Madigou, *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha encontrado que en el *Astatotilapia burtoni*, la estructura consiste de 5 exones (Robison, *et al.*, 2001).

Recientemente, se han identificado dos tipos de receptores en tilapia (Lehavi-Sivan, *et al.*, 2004). El primero, tiene un 83-84% de homología con varias especies de peces como el *Morone saxatilis*, *Dicentrarchus labrax* y *Seriola dumerilii* y un 50-51% de homología con el receptor IA del *Carassius auratus*. El segundo receptor clonado tiene un 95% de homología con *Astatotilapia burtoni*, un 70-86% con el receptor del tipo 2 de *Oryzias latipes* y con el receptor del tipo IA del *Carrasius auratus*. De acuerdo a su homología y su posición filogenética, los receptores de *Oreochromis niloticus* fueron nombrados como tGnRH-RI y tGnRH-RIII.

Función del GnRH-R.

La existencia de diferentes tipos y subtipos de receptores en una misma especie, así como su diferente distribución, no solo en áreas reproductivas, si no también en órganos periféricos, nos lleva a la pregunta de saber: ¿Estos tienen una distinta función?.

Los receptores para la GnRH, se han detectado a través de diferentes técnicas como inmunocitoquímica, análisis *in silico*, hibridación *in situ* y clonación molecular, encontrando que estos se distribuyen en diferentes órganos. En varias especies como el *Oncorhynchus masou*, *Astatotilapia burtoni*, *Dicentrarchus labrax* y *Oreochromis niloticus*, se ha reportado que los receptores, se distribuyen en distintas áreas del cerebro, hipófisis, retina ovario y testículo Además de localizarse en las branquias y el riñón de peces teleósteos. (Jodo, *et al.*, 2003; Madigou, *et al.*, 2002).

En el *Astatotilapia burtoni* y el *Oreochromis niloticus*, la distribución de los receptores, conocidos como Gnhr1 y Gnhr3, es diferente, El primero se localiza en el cerebro, dentro de los Bulbos olfativos hacia la medula, así como en las partes anterior y posterior dorsal de la hipófisis, sugiriendo que la función que realiza, permite modular a la GnRH, a través de la entrada sensorial y el crecimiento; y el segundo, se distribuye en áreas del cerebro y en la parte posterior de la adeohipófisis, la cual contiene a la LH y la FSH, sugiriendo que este tipo de receptor es importante en la regulación de la reproducción (Levavi-Sivan *et al.*, 2006).

La función más conocida para los receptores a la GnRH, es su participación en la regulación de la liberación de las gonadotropinas, por parte de las gonadotropas (Lethimonier, *et al.*, 2004; Millar, 2005; Rispoli & Nett, 2005). Para los receptores encontrados en el áreas del cerebro e hipófisis, se ha sugerido que su función está relacionada con regulación de la reproducción, además de participar como modulador sensorial, en donde se incluye al olfato, la vista, la línea lateral, las funciones fotoreceptivas, metabólicas y motoras (Chen & Fernald, 2006; Eisthen *et al.*, 2000; Soga, *et al.*, 2005). Cuando estos son encontrados en las gónadas, se cree que participan como un regulador parácrino en la gametogénesis y la esteroidogénesis (Madigou 2002). En *Astatotilapia burtoni*, se observó que los dos receptores pueden participar en el comportamiento social (Au, *et al.*, 2006).

Aún no se han esclarecido las diferentes funciones que pudieran tener en otros órganos que no están asociados directamente a las funciones reproductivas.

Señales de transducción de la GnRH.

En vertebrados, los mecanismos que median las señales de traducción de la GnRH para la estimulación de la liberación de las gonadotropinas, se hace a través de múltiples rutas de mensajeros secundarios (Chang & Jobin, 1994).

Se ha encontrado que la GnRH, se une a sus receptores en la membrana de las células gonadotropas, y la interacción estabiliza un cambio conformacional en el receptor que promueve la activación de estos. En las células gonadotropas de la hipófisis (Abe, *et al.*, 2002; Grosse, *et al.*, 2000), los receptores están asociados preferentemente a los miembros de la subclase de la proteína Gq (Grosse *et al.*, 2000), pero dependiendo de la zona extrahipofisiaria que expresa el receptor, este se acopla a alguna de las diversas proteínas G (Gq/11, Gs y Gi).

Aunque las señales de los GPCRs, es específica para cada tipo celular, la expresión de los heterologos resulta importante para generar la hipótesis acerca de que señales adicionales pueden estar interviniendo. En muchos de estos, se ha encontrado que existen otras rutas de señales independientes a la activación con las proteínas G (Ruf & Seafon, 2004).

Dichas proteínas G, activan a la Fosfolipasa C (isoforma β), y cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) a inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG).

El IP₃, moviliza el Calcio intracelular, el cual activa a la Proteínacinas C (PKC), en especial a las isoformas PKC β y PKC β -II, las cuales son encontradas en las células gonadotropas (Kraus, *et al.*, 2001; Junoy, *et al.*, 2002). La fase inicial del incremento del Calcio intracelular aumenta el funcionamiento del receptores al IP₃, en los almacenamientos intracelulares, mientras que en la fase de meseta, depende de la entrada del calcio externo, el cual se encuentra principalmente, vía canales de voltaje del tipo L, estimulando la síntesis y liberación de la LH y FSH, en donde se expresan las tres subunidades para estas (la subunidad α , LH β y FSH β) (Gur *et al.*, 2002; Timpsmark *et al.*, 2005; Counis *et al.*, 2005; Burger *et al.*, 2004; Ando *et al.*, 2001).

La fosfolipasa D y el A2, son inmediatamente activadas por las señales del receptor a la GnRH, probablemente por la vía de la PKC. La liberación retrazada de la DAG, por la fosfolipasa D, puede causar la activación de calcio independiente de la PKC (Shacham, *et al.*, 1999), las cuales estimulan rápidamente la actividad del receptor en las células gonadotropas (Harris, *et al.*, 1997).

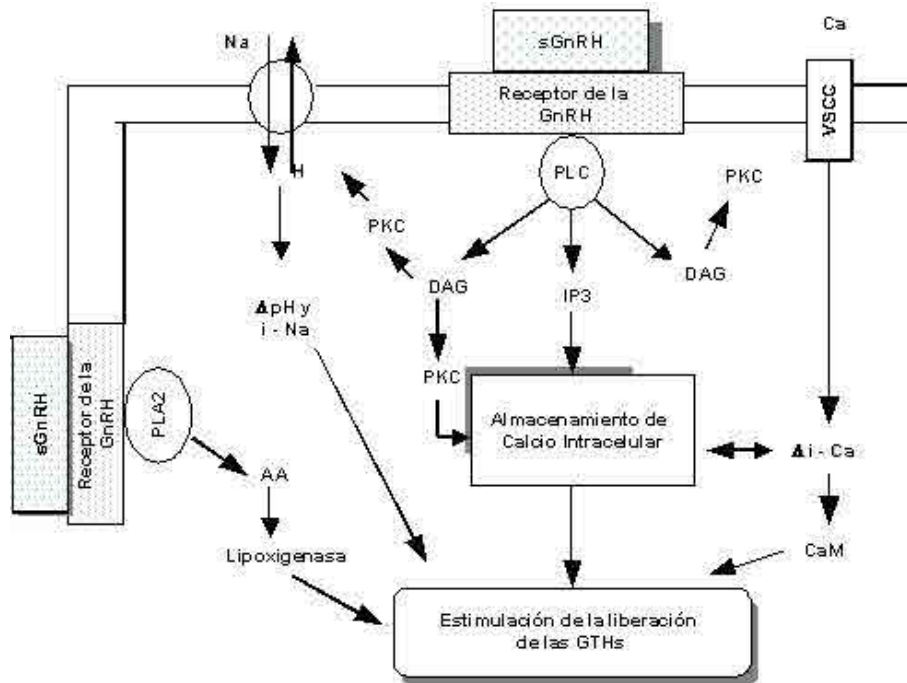


Fig. 10. Esquema en donde se resume las rutas de las señales de traducción (Modificado de Chang, *et al.*, 2000).

Se ha encontrado además que, existe otra vía de segundos mensajeros, en donde la Fosfolipasa A2 (PLA2), la cual se sabe que, es la enzima que regula la liberación del ácido araquidónico, en muchos tipos celulares (Nemenoff *et al.*, 1993) y la Fosfolipasa D (PLD), intervienen. Estas producen DAG y ácido araquidónico (AA) para activar la formación de más PKC y se siga la vía de segundos mensajeros. En *Carassius auratus*, se observó que el AA, es capaz de contribuir en la liberación de las gonadotropinas, a través de la liberación del calcio intracelular (Chang, 1996; Yaron & Lehavi-Sivan, 1990). Un estudio posterior, indica que, cuando el AA es liberado, existe la formación de

productos de lipoxigenasa, estimulando la liberación de las gonadotropinas, pero este mecanismo no está del todo claro (Shacham, *et al.*, 2001) (Figura 10).

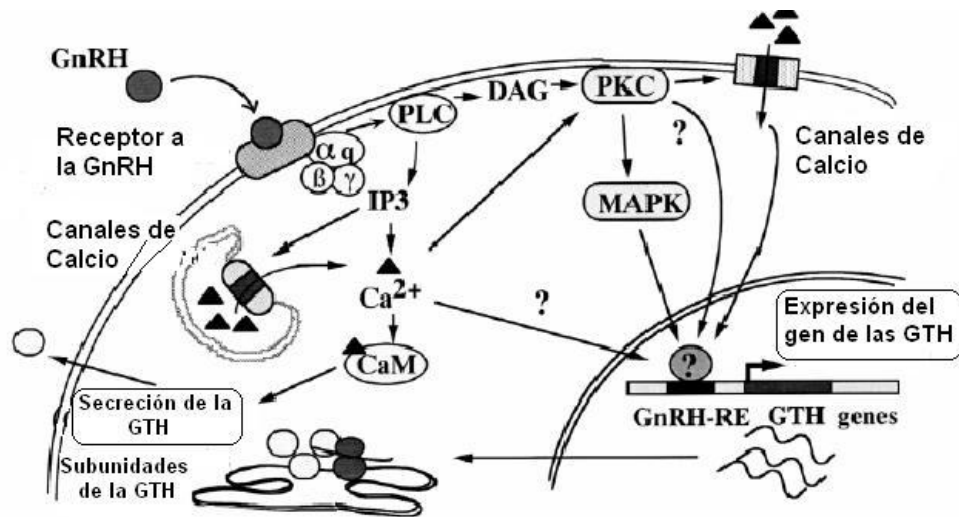


Fig. 11. Esquema donde se representa la acción de la GnRH en la expresión del gen de una de las subunidades para las gonadotropinas y su liberación.

Un estudio reciente indica que existe otra ruta que también participa en este mecanismo, la vía de Ca/ Cadmodulina dependiente de la Cinasa II (Ca/CAMPK). Probablemente, actúa como uno o más factores de transcripción sensibles a la GnRH, como promotor de la subunidad de la LH β y regulando la expresión de la LH. (Pawson & McNeilly, 2005; Haisenleder, *et al.*, 2003; Ando, *et al.*, 2005).

Por otra parte, en tilapia, se ha encontrado que el AMPc, actúa como una vía alterna en la regulación de la expresión de los genes de las subunidades (Rispoli & Nett, 2005; Yaron *et al.*, 2001) (Figura 11).

Capítulo X. Evolución de la isoforma sGnRH.

Hace unos cuantos años, White *et al.* (1998), propusieron un árbol filogenético de las prepo-hormonas de la GnRH, que abarca desde los teleósteos hasta los mamíferos, y en el cual, todas fueron reunidas dentro de tres agrupamientos principales. En esta propuesta no se presenta afectación por la inclusión de nuevas isoformas descubiertas y hasta la fecha ha sido ampliamente aceptada (Okubo *et al.*, 1999; Okubo *et al.*, 2000; Okubo & Aida 2001; Dubois *et al.*, 2002; Lethimonier *et al.*, 2004; Vickers *et al.*, 2004). Dentro de los tres agrupamientos, se nombra como GnRHI, al grupo que contiene todas las isoformas de la GnRH, que están relacionadas con la función del control de la hipófisis y se expresan en neuronas que se encuentran dentro del área preóptica e hipotálamo. El grupo de la GnRH-II, contiene sólo a la isoforma conocida como cGnRH-II y se expresa en las neuronas del cerebro medio y por último, el grupo de la GnRH-III, que a la fecha, contiene solamente a la sGnRH, que se localiza en las neuronas de la región olfativa y el telencéfalo de teleósteos. El problema con estos tres agrupamientos, es la existencia de tres genes parálogos para los teleósteos, mientras que para los tetrápodos no se ha encontrado una tercera variante, siendo una posible explicación que al paso del tiempo este gen se haya perdido (Montaner *et al.*, 1999).

Algunos estudios, se han enfocado en sugerir la existencia de tres diferentes sistemas únicamente en los teleósteos, los cuales tienen distintas funciones fisiológicas (Parhar *et al.*, 1998; Dubois *et al.*, 2002). Sin embargo, el surgimiento de la sGnRH como sistema, sigue siendo un tema discutido. Se propone qué si la duplicación de la sGnRH, se presenta sólo en los teleósteos "*per se*" o se dio antes de la divergencia de los peces a tetrápodos. Algunos autores han sugerido que sí la duplicación fue reciente, se esperaría que las isoformas de la sGnRH las distintas isoformas de la sGnRH en diversas especies de peces óseos, se agruparán con alguna de las formas hipofisiotrópicas de la GnRH, con la implicación de que esta tercera, con características similares a la sGnRH, debería estar presente en el Sistema Nervioso Central en los diferentes grupos de vertebrados o si no, ausente como resultado de la pérdida del gen durante la evolución de los tetrápodos.

Una hipótesis alternativa es, que la duplicación que condujo a la aparición de la sGnRH, tan solo ocurrió dentro de los teleósteos, ello, basándose en las siguientes observaciones:

la isoforma de la mGnRH apareció durante la evolución temprana de los peces. Esto es confirmado por la presencia de esta isoforma en especies de peces no teleósteos y algunos teleósteos como la *Anguilla anguilla* y el *Pantodon buchholzi* (Sherwood *et al.*, 1991; Lescheid *et al.*, 1995). La presencia de la sGnRH está presente en algunas especies de lenguados, de la familia Osteoglossomorpha (O'Neill *et al.*, 1998; Okubo & Aida, 2001), el cual es el eslabón entre los peces óseos antiguos y el grupo de euteleósteos (Inoue *et al.*, 2001). Además, existe una gran familia de genes de GnRH para los peces teleósteos (Taylor *et al.*, 2003). Un hecho adicional es que la duplicación entera del genoma también se presentó dentro de estos organismos (Chen *et al.*, 2004; Hoegg *et al.*, 2004; Van de Peer, 2004). Por ejemplo, para muchas familias de genes, se han encontrado dos copias parálogas en especies como el *Danio rerio* y en *Tetraodon nigroviridis* y en los tetrápodos solamente está presente un ortólogo (Wittbrodt *et al.*, 1998). Otro claro ejemplo es el que, se ha observado en ciertas especies tetraploides, que existe la presencia de dos genes para la sGnRH o de la cGnRH-II (Lin & Peter, 1997; Ferriere *et al.*, 2001; Gray *et al.*, 2002; Uzbekova *et al.*, 2002).

También se postula que la sGnRH surgió de mutaciones puntuales del gen de la mGnRH o después de su duplicación y su subsecuente divergencia, esto implicaría que los factores de transcripción participantes, deberían permanecer conservados o ser similares entre los promotores correspondientes. (Figura 12). Dentro de este argumento, estudios con genes reporteros, han confirmado la importancia de esta región para la expresión de células específicas en *Danio rerio*, demostrando que el promotor de la mGnRH en el humano, es capaz de conducir a la expresión específica del gene del reportero en células del *Danio rerio* transgénico (Torgensen *et al.*, 2002). Recientemente, Kuo *et al.*, (2005), suponen que después de la separación de los peces actinopterigios y los peces sarcopterigios, el antecesor de la forma hipofisiotrópica fue duplicada, ocasionando un antecesor de la GnRH, probablemente entre la isoforma de la mGnRH y la isoforma sGnRH.

Aunque algunos trabajos han reportado evidencias de la presencia de una tercera variante ligada a la GnRH en los mamíferos, estudios detallados han fallado al purificar a esta neurohormona y por lo tanto, al demostrar su presencia. Al respecto, estudios en la secuencia del genoma en el humano y el ratón, han sido negativas al identificar a la sGnRH en estas especies (Hapgood, 2005; Kuo *et al.*, 2005).

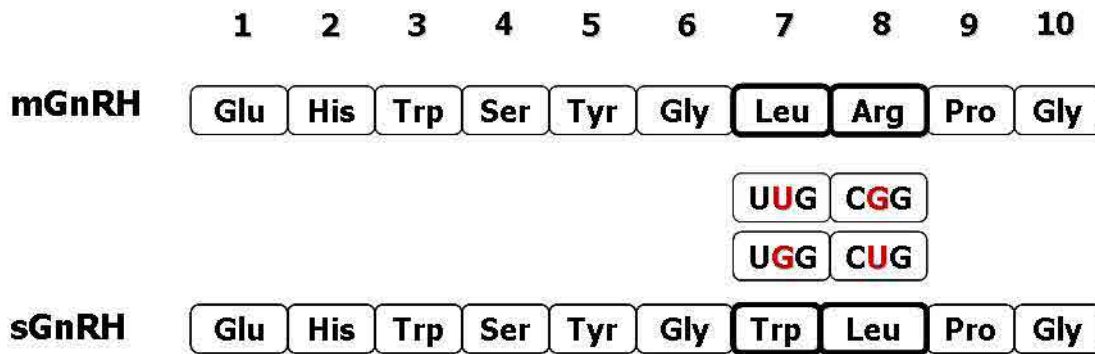


Fig. 12. Secuencia de aminoácidos para dos isoformas de la GnRH: mGnRH y sGnRH. Destacando que en las posiciones 7 y 8, se encuentran dos sustituciones en sus tripletes, un Uracilo por una Guanina y una Guanina por un Uracilo, respectivamente.

Capítulo XI. Uso de la GnRH y sus análogos.

La acuicultura se ha practicado desde hace muchos siglos y con el avance en los conocimientos, se han usado en las últimas décadas métodos más industrializados.

El cultivo intensivo de peces provoca, en la mayoría de los casos, variaciones respecto a las condiciones en las que se encuentran las poblaciones naturales, provocando alteraciones en su ciclo reproductivo. De hecho, numerosas especies no se reproducen durante el primer año en estado de cautiverio, probablemente por la falta de síntesis y/o liberación de gonadotropinas en este período y otras no lo llegan a hacer nunca (Matsuyama et al., 1991).

Uno de los problemas más serios, en el desarrollo de la acuicultura comercial, es la implementación de nuevos programas de mejora en el control de los procesos genéticos y reproductivos en peces en cautiverio. En donde, la manipulación de varios parámetros ambientales, tales como temperatura, fotoperiodo, salinidad, volumen y profundidad del estanque, vegetación del substrato, etc., pueden mejorar frecuentemente la eficacia en la etapa de desove. Sin embargo, en algunas especies, los tratamientos hormonales son los únicos medios de controlar la reproducción confiablemente. En los últimos años, una variedad de pruebas hormonales se han utilizado con éxito.

Hoy en día, varios agonistas sintéticos de la GnRH (GnRHa) altamente potentes, son usados en muchas especies de vertebrados, incluidos a los peces teleósteos (Zohar & Mylonas, 2001).

Este método ha contribuido significativamente al desarrollo de más técnicas confiables para el control de la reproducción de los peces óseos.

El diseño de análogos esta enfocada al mejoramiento no solo en las funciones reproductivas, si no, en los procesos que involucran la unión al receptor y su efecto para la activación subsecuente que generan estos, así como la resistencia a la degradación por las peptidasas (Schneider *et al.*, 2006; Padula, 2005).

La utilización de los péptidos de la GnRH, para inducir la etapa de puesta en los peces, tiene importantes ventajas para el uso terapéutico derivado del efecto fisiológico en la liberación de la GtH (Peters, 2005). Primero, la GnRH y sus agonistas, son pequeños deca péptidos que no generan una inmunorespuesta y pueden ser usados varias veces en las subsecuentes puestas, sin que exista una reducción en su eficacia.

En segundo lugar, este tipo de péptido, induce la liberación de la LH endógena, además de que este “repara” las interrupciones endocrinas, que se presentan en los peces en que se encuentran en cautiverio, promoviendo la maduración final de sus ovocitos (FOM), a la ovulación y la etapa de puesta, que en el cautiverio con mucha frecuencia, se interrumpen. También, la GnRH actúa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Por lo tanto, la GnRH puede proporcionar un estímulo más equilibrado en los eventos reproductivos y, probablemente, existe una mejor integración de estos con otras funciones fisiológicas, que va afectar directamente e indirectamente la liberación de otras hormonas necesarias para FOM, la espermiación y la puesta. Tales hormonas incluyen a la prolactina, hormona de crecimiento y hormonas tiroideas. Una tercera ventaja de los GnRH analogos (GnRHa), es que pueden ser sintetizados y ser obtenidos en forma pura, y no tiene el riesgo de transmitir enfermedades (como lo son los extractos de hipófisis en los peces). Finalmente, debido a la semejanza estructural de las distintas isoformas de GnRHs, para muchas especies de peces, el uso de GnRHs, a diferencia del uso de gonadotropinas, es genérico y el mismo GnRHa se ha aplicado con éxito a una amplia gama de la especie de los peces. En donde la [D-Arg6, Pro9, NEthylamida]- salmón, se ha usado para la inducción de la liberación de la GtH en varias especies de peces como el *Carassius auratus* y el *Onchorhynchus mikiss*. Se ha visto que, este análogo tiene una mayor resistencia a la degradación enzimática, así como una vida media más larga en comparación con la forma natural de la sGnRH (Gothilf & Zohar, 1991).

En los salmónidos, se ha demostrado que el GnRHa, al ser implantado dentro del músculo dorsal, incrementa la cantidad de los mRNAs, que codifican para las subunidades α y β de la LH, en la etapa de prepuesta (Kitahashi *et al.*, 1994; Kitahashi *et al.*, 2004). Además, también se tiene reportado que existe un incremento de los mRNAs de las subunidades α y β de la FSH (Ando *et al.*, 2004; Ando & Urano, 2005; Chong *et al.*, 2004; Hassin *et al.*, 2000).

En estas especies también se ha demostrado que el tratamiento con el GnRH α , incrementa la cantidad de los mRNAs de la Hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL) y somatolactina (SL), probado en organismos juveniles y maduros. En donde los niveles par la GH, se elevan durante el invierno y en la primavera se incrementan los mRNAs para la PRL y solo para la SL solo se tiene reportado la existencia de un incremento, sin indicar en que época se presenta (Bhandari *et al.*, 2003).

Para el caso de salmones maduros, el GnRH α incrementa la cantidad de mRNAs que codifican para las subunidades de la GtH en la hipófisis, además de elevar los niveles plasmáticos de las hormonas esteroides (Kitahashi, 2004; Onuma, 2005).

En el *Pagrus major*, se ha visto que la implantación de GnRH α , indce a la vitelogénesis y a la ovulación en hembras juveniles (Kumakura *et al.*, 2003)

Discusión:

Desde su descubrimiento, la GnRH ha sido una hormona que generó una gran expectativa por su función y potencial de aprovechamiento.

En los últimos 15 años, el cúmulo de conocimientos sobre su estructura genética, la regulación de su transcripción, las isoformas y variantes, distribución en el encéfalo y fuera de este, en las diversas etapas del desarrollo, así como las diversas funciones con las que es vinculada, su presencia en diversos organismos invertebrados y vertebrados, se ha incrementado de manera exponencial.

Por este nuevo bagaje de conocimientos que se han ido aportando, se están generando nuevos enfoques y explicaciones acerca del origen, evolución, distribución, regulación y funciones de las variantes de las GnRHs.

Primero, referiremos que la propuesta de clasificar las variantes de acuerdo a su localización en el encéfalo como: GnRH-I, GnRH-II y GnRH-III, ha ido cobrando fuerza entre los estudiosos de este decapeptido, ya que dicha molécula, se ha vinculado con las diferentes funciones en lo referente a su distribución en el encéfalo y nervio terminal, y con ello, facilitando la comprensión de los fenómenos en los cuales participa, independientemente de la isoforma (por las variaciones que existan en los aminoácidos), de que se trate, esclareciendo que no obstante no ser exactamente la misma variante, al expresarse en una región anatómica específica del cerebro, cumplirá con un papel particular (Okubo, *et al.*, 2000; Somoza *et al.*, 2002).

Así, de acuerdo, con los criterios anatofuncionales, la GnRH-I, se ubica en el APO y el hipotálamo, teniendo funciones hipofisiotrópicas, además de vincularse con la conducta, de acuerdo con el organismo del cual se trate. En este grupo participan principalmente las isoformas, sGnRH, mGnRH, wfGnRH, pjGnRH o mdGnRH, hgGnRH, cfGnRH y sbGnRH, para peces, anfibios, reptiles, mamíferos y humanos (Adams, 2002; Lethimonier *et al.*, 2004; Somoza *et al.*, 2002; Tsai, 2006; Yamamoto, 2003; Zandbergen *et al.*, 1995).

La GnRH-II, es constante y siempre se presenta el cerebro medio, asumiendo un papel de neuromodulador. En todos los casos, la isoforma que se encuentra en todos los grupos de vertebrados es la cGnRH-II, siendo esta considerada como la isoforma evolutivamente más conservada (Okubo *et al.*, 2000; Soga *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1995; Powell *et al.*, 1994).

El último de los sistemas, corresponde a la GnRH-III, este se localiza en el nervio terminal. Hasta la fecha, solo se tiene descrita a la isoforma sGnRH. 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 se pueda constatar si existen o no, las mismas funciones o la existencia de otras isoformas de acuerdo a la especie en cuestión (Hollan, *et al.*, 1994; Lundin, 1993; Ohno, 1993).

Resulta interesante que hasta la fecha, solo el primer sistema, sea el único en presentar diferentes isoformas de acuerdo a la especie que se trate. Hasta el momento, nadie ha postulado una posible explicación para ello. Esta variedad molecular nos permite comprender, al menos en parte, la evolución de los ligandos con sus receptores que se presentan en la hipófisis de los diversos vertebrados. Estos responden de manera diferencial a las isoformas como lo han reportado diferentes autores (Barran *et al.*, 2005; Millar, 2003; Millar, 2004; Millar, 2005). Es también sugerente que, los otros dos sistemas, no han podido, ser reemplazados por otra variante de una mejor manera, por lo que en vertebrados, se conservan las mismas variedades y estas se presentan de manera constante.

De igual manera, la estructura del gen, parece reafirmar la idea de esta alta presión selectiva, ya que el número de intrones y exones que conforman a cada uno de los genes en las diferentes especies es igual. También el orden que guarda en la estructura de la preprohormona, con la presencia de: un péptido señal, la hormona, el sitio de procesamiento y el GAP, presentan poca variación en general. De esta, la secuencia que ha sufrido mayores cambios es el GAP, cuya función hasta la fecha, no ha sido del todo comprendida y, en apariencia, es la que a pesar de las variaciones que presenta, no afecta la función primaria de la molécula (Cárdenas, 1997; Gobert, *et al.*, 1992; Kuo, *et al.*, 2005; Sherwood, *et al.*, 1994).

Es interesante hacer notar, que aún para una misma isoforma de la GnRH, la secuencia genética del GAP, puede variar entre las distintas especies y mantenerse constante con el resto de la molécula (Pandolfi *et al.*, 2005; Sherwood & Wu, 2005; Yu *et al.*, 1997). Todo ello en su conjunto, es lo que hace pensar que esta región, puede ser la menos importante de toda esta preprohormona.

La evolución paralela de los receptores de las GnRHs (GnRHRs) con sus ligandos, aunque no sabe del todo que tipo de receptor es afín a las distintas isoformas de la GnRH. Sin embargo, se sabe que las isoformas del sistema 1 y 2, se pueden unir al receptor del tipo 1.

En el caso de los peces, se cree que con la presencia de dos a tres variantes de la GnRH, también existe la presencia de dos o tres receptores afines a estos. De hecho, algunos receptores de peces, se han demostrado que responden eficazmente a más de una variante de GnRH. Las comparaciones entre los receptores de la GnRH, pueden confundirse, porque los nombres se les han asignado según la cronología y su derivación de la secuencia o en base a sus características filogenéticas, farmacológicas, o funcionales (Millar *et al.*, 2004). Por lo tanto, su nomenclatura actual es confusa. Además, existe el reporte de que hay más genes del receptor de GnRH que están presentes en el genoma de peces, comparado con los anfibios y los mamíferos. Existen cinco genes reportados en pufferfish y el salmón (*Oncorhynchus Masou*), tres secuencias completas en *Danio rerio* y el medaka (Okubo y otros., 2003). Se cree que estas copias se pudieron haber generado de la duplicación entera del genoma en los peces ancestrales, seguido por divergencia lenta en su secuencia. Análisis de primario las estructuras demuestran que los receptores de GnRH del teleósteos pueden ser clasificados en dos o tres grupos separados (Lethimonier *et al.*, 2004; Okubo *et al.*, 2003), pero su relación a los receptores mamíferos incompleto.

Para las distintas isoformas de la GnRHs, quizá lo que menos ha variado, son los mecanismos de regulación para su liberación. En los cuales se tiene que los tipos de receptores, así como sus rutas de transducción, se han conservado a través de la evolución con sus ligandos, pensando que, a pesar de las variaciones de la hormona, este mecanismo se ha mantenido hasta la fecha (Guilgur, *et al.*, 2006).

Conclusiones.

- En teleósteos, la sGnRH participa activamente en procesos que intervienen en la reproducción y aspectos sociales.
- En este mismo grupo de peces, la GnRH está presente como GnRH-1 o GnRH-3.
- Las GnRH-1 y GnRH-3 tienen un origen embrionario distinto y responden a diferentes estimuladores, teniendo en consecuencia, una expresión diferencial.
- La presencia de esta isoforma para especies de teleósteos, a diferencia de las demás, que pueden encontrarse en los vertebrados, es clave en el proceso de evolución de esta neurohormona, indicándonos que esta pudo surgir durante la transición hacia los tetrápodos.

Como conclusión general se puede señalar que el presente trabajo cumplió con sus objetivos al haber recabado la información actualizada más pertinente respecto a: aspectos moleculares, evolutivos, reproductivos y funcionales de la GnRH para los peces teleósteos.

Referencias:

Abe, H. & Oka, Y. 2002. Mechanism of the modulation of pacemaker activity by GnRH peptides in the terminal nerve-GnRH neurons. **Zool Sci.** 19: 111-128.

Adams, B., Tello, J., Erchegeyi, J., Warby, C., Hong, D., Akinsanya, K., Mackie, G., Vale, W., Rivier, J. & Sherwood, N. 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., Vickers, E., Warby, C., Park, M., Fischer, W., Grey Craig, A., River, J. & Sherwood, N. 2002. Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis*. **Biol Reprod.** 67: 232-239.

Alok, D., Hassin, S., Sampath, K., Trant, J., Yu, K. & Zohar, Y. 2000. Characterization of a pituitary GnRH-receptor from a perciform fish, *Morone saxatilis*: functional expression in a fish cells line. **Mol Cell Endocrinol.** 168: 65-75.

Amano, M., Ashihara, M., Yoshiura, Y., Kitamura, K., Ikuta, K. & Aida, K. 1998. Two differing salmon GnRH precursor mRNAs are co-expressed in the brain of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **Cell Tissue Res.** 292: 267-273.

Amano, M., Oka, Y., kitamura, S., Ikuta, K. & Aida, K. 1998. Ontogenic development of salmon GnRH and chicken GnRH-II systems in the brain of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). **Cell Tissue Res.** 293: 427-434.

Amano, M., Oka, Y., Aida, K., Okumoto, N., Kawashima, S. & Hasegawa, Y. 1991. Immunocytochemical demonstration of salmon GnRH and chicken GnRH-II in the brain of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. **J Comp Neurol.** 314: 587-597.

Amano, M., Okubo, K., Yamanome, T., Oka, Y., Kawaguchi, N., Aida, K. & Yamori, K. 2004. Ontogenic development of three GnRH systems in the brain of pleuronectiform fish, Barfin flounder. **Zool Sci.** 21: 311-317.

Amano, M., Okubo, K., Yamanome, T., Oka, Y., Kitamura, S., Ikuta, K., Takahashi, A., Aida, K. & Yamori, K. 2003. GnRH systems in masu salmon and barfin flounder. ***Fish Phys Biochem.*** 28: 19-22.

Amano, M., Takahashi, A., Yamanome, T., Okubo, k. & Yamamori, K. 2002. Molecular cloning of three cDNAs encoding different GnRH in the brain of Barfin flounder. ***Gen Comp Endocrinol*** 126: 325-333.

Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R. & Guillemin, R. 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 44:205-210.

Anctil, M. 2000. Evidence de gonadotropin-releasing hormone-like peptides cnidarian nervous system. ***Gen Com Endocrinol.*** 119: 317-328.

Anctil, M. & Tekaya, S. 2005. Gonadotropin-releasing Hormone-like immunoreactivity in the planarian *Bdelloura candida* (Plathyelmintes, Tricladida) ***Invert Biol.*** 124: 11-17.

Anderson, E., Fjelldal, P., Klenke, U., Vikingstad, E., Taranger, G.L., Zohar, Y., & Stefansson, S.O. 2001. Three forms of GnRH in the brain and pituitary of the turbot, *Scophthalmus maximus*: immunological characterization and seasonal variation. ***Comp Biochem Physiol B. Biochem. Mol Biol.*** 129: 551-558.

Ando, H., Hew, C. & Urano, A. 2001. Signal trasdution pathways and trascription factors ivolved in the gonadotropin-releasing hormone-estimated gonadotropin subunit gene expression. ***Comp Biochem Physiol Parte B.*** 129: 525-532.

Ando, H., Sasaki, Y., Okada, H. & Urano, A. 2001. Prepubertal increases in the levels of two salmon gonadotropin-releasing hormone mRNAs in the ventral telencephalon and preoptic area of masu salmon. ***Neurosci Lett.*** 307: 93-96.

Ando, H., Swanson, P., Kitani, T., Koide, N., Okada, H., Ueda, H. & Urano, A. 2004. Synergistic effects of salmon gonadotropin-releasing hormone and estradiol 17 β on

gonadotropin subunit gene expression and release in masu salmon pituitary cells *in vitro*. **Gen Comp Endocrinol.** 137: 109-121.

Ando, H. & Urano, A. 2005. Molecular regulation of gonadotropin secretion by Gonadotropin-releasing Hormone in salmonid fishes. **Zool Sci.** 22: 379-389.

Andreu-Vieyra, C. & Habibi, H. 2001. Effects of salmon GnRH and chicken GnRH-II on testicular apoptosis in goldfish (*Carassius auratus*). **Comp Biochem Physiol B.** 129(2-3):483-7.

Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J.M., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., Gelpke, M.D., Roach, J., Oh, T., Ho, I.Y., Wong, M., Detter, C., Verhoef, F., Predki, P., Tay, A., Lucas, S., Richardson, P., Smith, S.F., Clark, M.S. Edwards, Y.J., Zharkikh A., Tavtigian, S., Pruss, D., Barnstead, M., Evans, C., Baden, H., Powell, J., Glusman, G., Rowen, L., Hood, L., Tan, Y., Elgar, G., Hawkins, T., Venkatesh, B., Rokhsar, D. & Brenner, S. 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. **Sci.** 297:1301-1310.

Ashihara, M., Suzuki, M., Kubokawa, K., Yoshiura, Y., Kobayashi, M., Urano, A. & Aida, K. 1995. Two differing precursor genes for the salmon-type gonadotropin-releasing hormone exist in salmonids. **J Mol Endocrinol.** 15: 1-19.

Au, T., Greenwood, A. & Fernald, R. 2006. Differential social regulation of two pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. **Behav Brain Res.** 170: 342-346.

Baba, Y., Matsuo, H. & Schally, A. 1971. Structure of porcine LH-and FSH-releasing Hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. **Biochem Biophys. Res Commun.** 44:458-463.

Baker, C. & Bronner-Fraser, M. 2001. Vertebrate cranial placodes. I. Embryonic induction **Dev Biol.** 232: 1-61.

Barran, P., Roeske, R., Pawson, A., Sellar, R., Bowers, M., Morgan, K., Lu, Z., Tsuda, M., Kusakabe, T. & Millar, R. 2005. Evolution of constrained Gonadotropin-releasing hormone ligand conformation and receptors selectivity. **J Biol Chem.** 280: 38569-38575.

Belsham, D. & Lovejoy, D. 2005. Gonadotropin-releasing hormone: gene evolution, expression, and regulation. **Vitam Horm.** 71:59-94.

Bhandari, R., Taniyama, S., Kitahashi, T., Ando, H., Yamauchi, K., Zohar, Y., Ueda, H. & Urano, A. 2003. Seasonal changes of responses to gonadotropin-releasing hormone analog in expression of growth hormone/prolactin/somatolactin genes in the pituitary of masu salmon. **Gen Comp Endocrinol.** 130:55-63.

Biju, K., Gaikwad, A., Sarkar, S., Schreiber, M. & Subhedar, N. 2005. Ontogeny of GnRH-like immunoreactive neuronal systems in the forebrain of the Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. **Gen Comp Endocrinol.** 141: 161-171.

Blomenrohr, M., Bogerd, J., Leurs, R. & Goos, H. 2002. Differences in structure-function relations between nonmammalian and mammalian GnRH receptors: what we have learnt from the African catfish GnRH receptor. **Prog Brain Res** 141: 87-93.

Bogerd, J., Diepenbroek, W., Hund, E., Van, O., Teves, A., Leurs, R. & Blomenrohr, M. 2002. Two gonadotropin-releasing hormone receptors in the African catfish: no differences in ligand selectivity, but differences in tissue distribution. **Endocrinol.** 143: 4673-4682.

Bogerd, J., Zandbergen, M., Andersson, E., Goos, H., Th. 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.** 222:541-549.

Bonfil, D., Chuderland, D., Kraus, S., Shahbazian, D., Friedberg, I., Seger, R., Naor, Z. 2004. Extracellular signal-regulated kinase, Jun N-terminal kinase, p38, and c-Src are involved in gonadotropin-releasing hormone-stimulated activity of the glycoprotein hormone follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter. **Endocrinol.** 145:2228-44.

Burger, L., Haisenleder, J., Dalkin, A. & Marshall, J. 2004. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. **J Mol Endocrinol.** 33, 559–584.

Burmeister, S., Jarvis, E. & Fernald, R. 2005. Rapid Behavioral and Genomic Responses to Social Opportunity. **Plos Biology.** 11: 1996-2004.

Cárdenas, R. 1996. Regulación endocrina de la reproducción y el crecimiento en peces óseos. **Ciencia y Desarrollo**. 131:22-28.

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

Caunt, C., Finch, A., Sedgley, K. & McArdle, A. 2006. GnRH receptor signalling to ERK: kinetics and compartmentalization. **Trends Endocrinol Metab.** 17(8):308-13.

Chang, J., Johnson, J., Van Goor, R., Wong, C. Yunker, W., Uretsky, A., Taylor, D., Jobin, R., Wong, A. & Goldberg, J. 2000. Signal transduction mechanisms mediating secretion in goldfish gonadotropes and somatotropes. **Biochem Cell Biol.** 78: 139-153.

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

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

Chen, W.J., Ortí, G., Meyer, A., 2004. Novel evolutionary relationship among four fish model systems. **Trends Genet.** 20, 424–431.

Chiba, H., Nakamura, M., Iwata, M., Sakuma, Y., Yamauchi, K., Parhar, I.S., 1999. Development and differentiation of gonadotropin hormone-releasing hormone neuronal systems and testes in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 114, 449–459.

Chong, K., Wang, S. & Melamed, P. 2004. Isolation and characterization of follicle-stimulating hormone β subunit gene and 5' flanking region of the Chinook salmon. **Neuroendocrinol.** 80: 158-170.

Chow, M., Kight, K. Gothilf, Y., Alok, D., Stubblefield, J. & Zohar, Y. 1998. Multiple GnRHs present in a teleost species are encoded by separate genes: analysis of the sbGnRH and

the cGnRH-II genes from the striped bass, *Morone saxatilis*. **J Mol Endocrinol.** 21: 277-289.

Clarke, I. & Pompolo, S. 2005. Synthesis and secretion of GnRH. **Anim Reprod Sci.** 88: 29-55.

Collins, P., O'Neill, P., Barron, B., Moore, R. & Sherwood, N. 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: 173-175.

Counis, R., La Verrière, J., Garrel, C., Cohen-Tannoudji, J., Lerrant, Y., Kottler, M. & Magre, S. 2005. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. **Reprod Nutr.** 45: 243-254.

Dellovade, T., King, J., Millar, R. & Rissman, E. 1993. Presence and differential distribution of distinct forms of gonadotropin-releasing hormone in the musk shrew brain. **Neuroendocrinol.** 58: 166-177.

Dickey, J. & Swanson, P. 2000. Effects of salmon gonadotropin-releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Gen Comp Endocrinol.** 118 : 436-449.

Di Cosmo, A. & Di Cristo, C. 1998. Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF. 17:1-12.

Dobkin-Bekman, M., Naidich, M., Pawson, A., Millar, M., Seger, R. & Naor, Z. 2006. Activation of Mitogen-activated protein kinase (MAPK) by GnRH is cell-context dependent. **Mol Cell Endocrinol.** En prensa.

Duan, W., Ito, M., Park, Y., Maizels, E., hunzicker-Dunn, M. & Jameson, J. 2002. GnRH regulates early growth response protein 1 transcription through multiple promoter elements. **Mol Endocrinol.** 16: 221-233.

Dubois, E. A., Zandbergen, M. A., Peute, J. & Goos, H. 2002. Evolutionary development of three gonadotropin releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. **Brain Res Bulletin**. 57: 413-148.

Eisthen, H., Delay, R., Wirsig-Wiechman, C. & Dione, V. 2000. Neuromodulatory effects of gonadotropin releasing hormone on olfactory receptor neurons. **J Neurosci**. 20: 3947-3955.

Enomoto, M. & Kyun, M. 2004. GnRH as a cell proliferation regulator: Mechanism of action and evolutionary implications. **Zool Sci**. 21: 1005-1013.

Ferguson, S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. **Pharmacol Rev**. 53: 1-24.

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

Fernald, R. 2002. Social regulation of the brain: sex, size and status. **Novartis Found Symp**. 244:169-184.

Fernández-Fernández, R., Martín, A., Navarro, V., Castellano, J., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. 2006. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. **Mol Cell Endocrinol**. 254-255: 127-132.

Ferriere, F., Uzbekova, S., Breton, B., Jégo, P. & Bailhache, T. 2001. Two different messenger RNAs for Salmon Gonadotropin-Releasing Hormone (sGnRH) are expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain. **Gen Comp Endocrinol**. 124: 321-332.

Gautron, J., Leblanc, P., Bluet-Pajot, M., Pattou, E., L'Heritier, A., Mounier, F. Ponce G, Audinot V, Rasolonjanahary R, & Kordon C. 1991. A second endogenous molecular form of mammalian hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), (hydroxyproline⁹) LHRH, releases luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in vitro and in vivo. **Mol Cell Endocrinol** 85: 99-107.

Gautron, J., Gras, C. & Enjalbert, A. 2005. Molecular polymorphism of native gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in restricted to mammalian GnRH and [hidroxiprolina⁹] GnRH in the developing rat brain. **Neuroendocrinol.** 81: 69-86.

Givens, M., Korotani, R., Rave-Harel, N., Millar, N. & Mellon, P. 2004. Phylogenetic footprinting reveals evolutionarily conserved regions of the Gonadotropin-releasing hormone gene that enhance cell-specific expression. **Mol Endocrinol.** 18: 2950-2966.

Gobert, A., Guibert, B., Lenoir, V., Kerdelhue, B. & Leviel, V. 1992. GnRH-associated peptide (GAP) is present in the rat striatum and affects the synthesis and release of dopamine. **J Neurosci Res.** 31(2):359-64.

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

González-Martínez, D., Zmora, N. & Mañanos, E. 2002. Immunohistochemical localization of three different prepo-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. **J Comp Neurol.** 446: 95-113.

Gopinath, A., Tseng, A. & Whitlock, K. 2004. Temporal and spatial expression of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the brain of developing zebrafish (*Danio rerio*). **Gene Expression Patterns.** 4: 65–70.

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

Gothilf, Y., Zohar, Y., 1991. Clearance of different forms of GnRH from the circulation of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, in relation to their degradation and bioactivities. In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. Eds., Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 91, Sheffield, pp. 35–37.

Gray, S., Adams, B., Warby, C., von Schalburg, K. & Sherwood, N. 2002. Transcription and Translation of the salmon Gonadotropin-Releasing Hormone Genes in brain and gonads of sexually maturing Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biol Reprod.** 67: 1621-1627.

Greenwood, A. & Fernald, R. 2004. Social regulation of the electrical properties of gonadotropin-releasing hormone neurons in a cichlid fish (*Astatotilapia burtoni*). **Biol Reprod.** 71:909-18.

Grober, M., Myers, T., Marchaterre, M., Bass, A. & Myers D. 1995. Structure, localization and molecular phylogeny of a GnRH cDNA from a paracanthopterygian fish, the plainfin midshipman (*Porichthys notatus*). **Gen Comp Endocrinol.** 99: 85–99.

Grosse, R., Schmid, A. & Schonerberg, T. 2000. Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to Gq/11 proteins. **J Biol Chem.** 275: 9193-9200.

Guilgur, L., Moncaut, N., Canàrio, A. & Somoza, G. 2006. Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. **Comp Biochem Physiol.** 144: 272-283.

Gur, G., Banfil, D., Safarian, H., Naor, Z. & Yaron. 2002. GnRH signaling pathways regulate differentially the tilapia gonadotropin subunit genes. **Mol Cell Endocrinol.** 189: 125-134.

Gur, G., Banfil, D., Safarian, H., Naor, Z. & Yaron. 2001. GnRH receptor signaling in tilapia pituitary cells: role of mitogen-activated protein kinase (MAPK). **Comp Biochem Physiol.** 129: 517-524.

Gur, G., Melamed, P., Gissis, A. & Yaron, Z. 2000. Changes along the pituitary-gonadal axis during maturation of the black carp, *Mylopharyngodon piceus*. **J Exp Zool.** 286(4):405-13.

Haisenleder, D., Burger, L., Aylor, K., Dalkin, A. & Marshall, J. 2003. Gonadotropin-releasing hormone stimulation of gonadotropin subunit transcription: evidence for the

involvement of calcium/calmodulin-dependent kinase II (Ca/CAMK II) activation in rat pituitaries.

Endocrinol. 144: 2768-74.

Harris, G. 1950. Oestrous rhythm: Pseudopregnancy and the pituitary stalk in the rat. **J Physiol.** 111: 347:360

Harris, D., Reiss, N., & Naor Z. 1997. Differential activation of protein kinase C delta and epsilon gene expression by gonadotropin-releasing hormone in alphaT3-1 cells. Autoregulation by protein kinase C. **J Biol Chem.** 272:13534-40.

Harris, D., Bonfield, D., Chuderland, D., Kraus, S., Seger, R., & Naor, Z. 2002. Activation of MAPK cascades by GnRH: ERK and Jun N-terminal kinase are involved in basal and GnRH-stimulated activity of the glycoprotein hormone LH beta-subunit promoter. **Endocrinol.** 1018-1025.

Hassin, S., Gothilf, Y., Blaise, O. & Zohar, Y. 1998. Gonadotropin-I and II subunit gene expression of male striped bass (*Morone saxatilis*) after gonadotropin-releasing hormone analogue injection: quantification using an optimized ribonuclease protection assay. **Biol Reprod.** 58 : 1233-1240.

Hassin, S., Claire, M., Holland, H. & Sohar, Y. 2000. Early maturity in the males striped bass *Morone saxatilis*: follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression and their regulation by gonadotropin-releasing hormone analogue and testosterone. **Biol Reprod.** 63: 1691-1697.

Higa, M., Kitahashi, T., Sasaki, Y., Okada, H. & Ando, H. 1997. Distinct promotor sequences of two precursor genes for salmon gonadotropin-releasing hormone in masu salmon. **J Mol Endocrinol.** 19:149-161.

Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J. & Meyer, A. 2004. Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. **J Mol Evol.** 59:190-203.

Hollan, P., Garcia-Fernandez, J., William, N. & Sidow, A.1994. Gene duplications and the origins of vertebrate development. **Dev Suppl.** 125-133.

Husebye, H., Collas, P., Alestrom, P. 1997.A functional study of the salmon GnRH promoter.**Mol Mar Biol Biotechnol.** 6(4):357-63.

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

Illing, N., Troskie, B., Naohorniak, C., Hapgood, J., Peter, R. & Millar, R.1999. Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential and differential distribution in the brain and pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). **Proc Natl Acad Sci. USA:** 96: 2256-2531.

Inoue, J., Miya, M., Tsukamoto, K. & Nishida, M. 2001. Mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. **Mol Phylogenetic Evol.** 20: 275-285.

Ishizaki, M., Iigo, M., Yamamoto, N. & Oka, K. 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: 2092–2103.

Iwakoshi, E., Takuwa-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.

Jímenez-Linan, M., Rubin, B. & King, J. 1997. Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. **Endocrinol.** 138: 4123-4130.

Jodo, A., Ando, H. & Urano, A. 2003. Five different types of putative GnRH receptor gene are expressed in the brain of the Masu salmon (*Oncorhynchus masou*). **Zool Sci.** 20: 1117-1125.

Junoy, B., Macario, H., Mas, J.L., Enjalbert, A. & Drouva, S.V. 2002. Proteasome implication in phorbol ester- and GnRH-induced selective down-regulation of PKC (alpha, epsilon, zeta) in alpha T(3)- 1 and L beta T(2) gonadotrope cell lines. **Endocrinol.** 143(4):1386-403.

Kah, O., Trudeau, V., Sloley, B., Chang, J., Dubourg, P., Yu, K. & Peter, R. 1991. Influence of GABA on gonadotrophin release in the goldfish. **Neuroendocrinology.** 1992 Apr;55(4):396-404.

Kaiser, U., Conn, M., & Chin, W. 1997. Studies of GnRH action using GnRH receptor expressing pituitary cell lines. **Endocrinol Rev.** 18: 46-70.

Kaiser, U., Halvorson, L. & Chen, M. 2000. Sp1, steroidogenic factor 1 (SF-1), and early growth response protein 1 (egr-1) binding sites form a tripartite gonadotropin-releasing hormone response element in the rat luteinizing hormone-beta gene promoter: an integral role for SF-1. **Mol Endocrinol.** 14: 1235-45.

Kasten, T., Whitte, S., Norton, T., Bond, C., Adelman, J. & Fernald, R. 1996. Characterization of two new prepoGnRH mRNAs in the three shrew: First direct evidence for mesencephalic GnRH gene expression in a placental mammal. **Gen Comp Endocrinol.** 104: 7-19.

Khdra, A. & Li, Y. 2006. A model for the pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone from synchronized hypothalamic neurons. **Biophys J.** 91(1):74-83.

Kim, J., Hayton, W. & Scultz, I. 2006. Modeling the brain-pituitary-gonad axis in salmon. **Marine Env Res.** En prensa.

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

King, J. & Millar, R. 1982. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. II. Isolation and characterization. **J Biol Chem.** 257:10729-10732.

Kitahashi, T., Alok, D. Ando, H., Kaeriyama, M., Zohar, Y., Ueda, H. & Urano, A. 1998. GnRH analog stimulates gonadotropin II gene expression in maturing sockeye salmon. **Zool Sci USA**. 15: 761-765.

Kitahashi, T., Bhandari, R., Taniyama, S., Ando, H., Ueda, H. & Urano, A. 2004. Changes in expression of salmon GnRH genes and responsiveness of pituitary hormone genes to GnRH analog during growth and sexual maturation in masu salmon. **Trends in Comparative endocrinology**. 92-94.

Kitahashi, T., Sato, H., Sakuma, Y. & Parhar, I. 2005. Cloning and functional analysis of promoters of three GnRH genes in a cichlid. **Biochem Biophys Res Commun**. 336(2):536

Kobayashi, M., Amano, M., Kim M., Yoshiura Y., Sohn C., Suetake H., & Aida K. 1997. Gonadotropin-Releasing Hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. **Fish Physiol. and biochem**. 17: 1-8.

Krens, G. Spaink, H. & Snaar-Jagalska, E. 2006. Functions of the MAPK family in vertebrate development. **FEBS Lett**. 580: 4984-4990.

Kudo, H., Hyodo, S., Ueda, H., Hiroi, O., Aida, K., Yu, G. & Yamauchi, K. 1996. Cytophysiology of Gonadotropin-releasing hormone neurons in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) forebrain before and after upstream migration. **Cell Tissue Res**. 284: 470-487.

Kumakura, N., Okuzawa, K., Gen, K. & Kagawa, H., 2003. Effects of Gonadotropin-releasing Hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal axis of pre-pubertal female red seabream (*Pagrus major*). **Gen Comp Endocrinol**. 131: 264-273.

Kungland H., Lorens J.B., Andersen O., Kisen G.O. & Alestrom P. 1993. The Atlantic salmon prepro-gonadotropin-releasing hormone gene and mRNA. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 84 :167-174.

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

Leder, E., Danzmann & Ferguson, M. 2004. Comparison of GNRH3 genes across salmonid genera. **Anim Genet.** 35: 126-129.

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

Lehavi-Sivan, B. & Avitan, A. 2005. Séquense análisis, endocrine regulation, and signal traduction of GnRH receptors in teleost fish. **Gen. Comp. Endocrinol.** 142: 67-73.

Lehavi-Sivan, B., Safarian, H., Rosenfeld, H., Elizur, A. & Avitan, A. 2004. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene expression in tilapia: effect of GnRH and dopamine. **Biol. Reprod.** 70: 1545-1551.

Lehavi-Sivan, B., Biran, J. & Fierman, E. 2006. Sex steroids are envolved in the regulation of Gonadotropin-releasing hormone and dopamine D2 receptors in the female tilapia pituitary. **Biol Reprod.** En prensa.

Lescheid, D., Powell, J., Fischer, W., Park, M., Craig, A., Bukovskaya, O., Barannikova, I. & Sherwood N. 1995. Mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) identified by primary structure in Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti*. **Regul Pept.** 55:299-309.

Lin, X. & Peter, R. 1997. 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: 282–296.

Liu, F., Usui, I., Evans, L., Austin, D., Mellon, P., Olefsky, J. & Webster, N. 2002. Involvement of both G (q/11) and G(s) protein in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells. **J Biol Chem.** 277: 32099-32108.

Lovejoy, D., Fischer, W., Ngamvongchon, S., Craig, A., Nahorniak, C., Peter, R., Rivier, J. & Sherwood, N. 1992. Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*** 89: 6373-6377.

Lundin, L. 1993. Evolution of vertebrate genome as reflected in paralogous chromosomal regions in man and the house mouse. ***Genomics.*** 16: 1-19.

Madigou, T., Uzbekova, S., Lareyre, J. & Kah, O. 2002. Two messenger RNA isoforms of the gonadotropin-releasing hormone receptor, generated by alternative splicing and/or promoter usage, are differentially expressed in rainbow trout gonads during gametogenesis. ***Mol. Reprod. Dev.*** 63: 151-160.

Matsuyama, S., Saito, N., Taniyama, K. & Tanaka, C. 1991. Gamma-Aminobutyric acid is a neuromodulator in sinus node of guinea pig heart. ***Am J Physiol.*** 261: 1437-1442.

McArdle, C., Franklin, J., Green, L. & Hislop, J. 2002. The Gonadotrophin-Releasing Hormone Receptor: Signalling, Cycling and Desensitisation. ***Archives of Physiology and Biochemistry.*** 110: 113–122.

Melamed, P., Gur, G., Rosenfeld, H., Elizur, A., Schulz, R. & Yaron, Z. 2000. Reproductive development of male and female tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus* x *O. Aureus*) and changes in mRNA levels of gonadotropin (GTH) I β and II β subunits. ***J. Exp. Zool.*** 286: 64-75.

Millar, R. 2005. GnRHs and GnRH receptors. ***Animal. Reproduction Science.*** 88: 5-28.

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

Millar, R., Lu, Z., Pawson, A., Flanagan, C., Morgan, K. & Maudley, S. 2004. Gonadotropin-Releasing hormone receptors. ***Endocr. Rev.*** 25: 235-275.

Millar & Pawson, A. 2004. Outside-in and inside-out signaling: the new concept of ligand and binding at the gonadotropin-releasing hormone receptor is modulated by intracellular environment. **Endocrinol.** 145: 3590-3593.

Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K. & 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. USA.** 81: 3874-3878.

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

Mohamed, J. & Khan, I. 2006. Molecular cloning and differential expression of three GnRH mRNAs in discrete brain areas and lymphocytes in red drum. **J. Endocrinol.** 188: 407-416.

Mohamed, J., Thomas, P. & Khan, I. 2005. Isolation, cloning, and expression of the prepro-GnRH mRNAs in Atlantic Croaker brain and pituitary. **J. Comp. Neurol.** 488: 384-395.

Montaner, A., Park, M., Fischer, W., Craig, A., Chang, J., Somoza, G., Rivier, J. & Sherwood, N. 2001. Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone in the brain teleost, Pejerrey. **Endocrinol.** 142: 1453-1460.

Montaner, A.D., Affanni, J.M., King, J.A., Bianchini, J.J., Tonarelli, G., Somoza, G.M., 1999. Differential distribution of gonadotropin-releasing hormone variants in the brain of *Hydrochaeris hydrochaeris* (Mammalia, Rodentia). **Cell. Mol. Neurobiol.** 19: 635-651.

Montero, M., Vidal, B., King, J., A., Tramu, G., Vandesande, F., Dufour, S. & Kah, O. 1994. Immunocytochemical localization of mammalian GnRH (gonadotropin-releasing hormone) and chicken GnRH-II in the brain of the European silver eel (*Anguilla anguilla*). **J. Chem. Neuroanat.** 7: 227-241.

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

Mousa, M. & Mousa, S. 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. 1993. Evolution of gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuronal systems. **Brain Behav Evol.** 42: 215-230.

Myers, T. & Patonay, G. 2006. A new strategy utilizing electrospray ionization-quadrupole ion trap mass spectrometry for the qualitative determination of GnRH peptides. **J. Mass Spectrom.** 41: 950-959.

Naor, Z., Harris, D. & Shacham, S. 1998. Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca²⁺ and protein kinase C. **Front. Neuroendocrinol.** 19: 1-19.

Naor, Z., Bernard, O. & Seguer, R. 2000. Activation of MAPK cascades by G-Protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. **Trend Endocrinol Metab.** 11: 91-99.

Neil, J. 2002. GnRH and GnRH receptors genes in the human genome. **Endocrinol.** 143: 737-743.

Nemenoff, R., Winitz, S., Qian, N., Van Putten, V., Johnson, G. & Heasley, L. 1993. Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. **J Biol Chem.** 25: 1960-1964.

Nikolics, K, Mason, A., Szonyi, E., Ramachandran, J., Seeburg, P. 1985. A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. **Nature.** 316:511-517.

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

Ohno, S. 1993. Patterns in genome evolution. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 3: 911-914.

Oka, Y. 1992. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells of the terminal nerve as a model neuromodulator system. *Neurosci Lett*. 142:119-22.

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 teleost. **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, *Oryzias latipes*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 276: 298-303.

Okubo, K., Ishii, S., Ishida, J., Mitani, H., Naruse, K., Kondo, M., Shima, A., Tanaka, M., Asakawa, S. & Aida, K. 2003. A novel tirad gonadotropin-releasing hormone receptor in the medaka *Oryzias latipes*: evolutionary and functional implications. **Gene**. 314: 121-131.

Okubo, K., Sakai, F., Lau, E., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Naruse, K., Aida K. & Nagahama Y. 2006. Forebrain Gonadotropin-releasing hormone neuronal development: Insights from Transgenic Medaka and the relevance to X-Linked Kallmann Syndrome. **Endocrinol.** 147: 1076–1084

Okuzawa, K., Amano, M., Kobayashi, M., Aida, K., Hanyu, I., Hasegawa, Y. & Miyamoto, K. 1990. Differences in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in discrete brain

areas of male and female rainbow trout according to age and stage of maturity. **Gen Comp Endocrinol.** 80 :116-126.

Okuzawa, K., Araki, K., Tanaka, H., Kagawa, H. & Horose, K. 1994. Molecular cloning of cDNA encoding the pre-pro-salmon gonadotropin-releasing hormone of the Red Seabream. **Gen. Comp. Endocrinol.** 96: 234–241.

Okuzawa, K., Furukawa, K., Aida, K. & Hanyu, I. 1994. The effect of water temperature on gonadotropin-releasing hormone contents in the discrete brain areas and pituitary of male moroko *Gnathopogon caeruleus*. **Fish. Sci.** 60: 155-158.

Okuzawa, K., Gen., K., Bruysters, M., Bogerd, Y., 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., Kumakura, N., Mori, A., Gen, K., Yamaguchi, S., Kagawa, H., 2002. Regulation of GnRH and its receptor in a teleost, red seabream. Gonadotropin-releasing Hormone: Molecules and Receptors, **Progress in Brain Research.** 141: 95–110.

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

O'Neill, D., Powell, J., Standen, E., Youson, J., Warby, C. & Sherwood, N. 1998. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ancient teleosts, the bonytongue fishes: putative origin of salmon GnRH. **Gen Comp Endocrinol.** 112: 415-425.

Onuma, T., Ando, H., Koide, N., Okada, H. & Urano, A. 2005. Effects of salmon GnRH and sex steroid hormones on expression of genes encoding growth hormone/prolactin/somatolactin family hormones and a pituitary-specific transcription factor in masu salmon pituitary cells in vitro. **Gen. Comp. Endocrinol.** 143: 129: 141.

Osornio, G. 2001. Cuantificación de células gonadótropas en la hipófisis de pez dorado (*Carassius auratus*). Tesis de licenciatura. FES-I. UNAM. pp. 1.

Padula, A. 2005. GnRH analogues—agonists and antagonists. ***Animal Reproduction Science***. 88 : 115–126.

Pandolfi, M., Parhar, I., Ravaglia, M., Meijide, F., Maggese, C. & Paz, D. 2002. Ontogeny and distribution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems in the brain of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. ***Anat. Embriol.*** 205: 271-281.

Pandolfi, M., Muñoz-Cueto, J.A., Lo Nostro, F.L., Downs, J.D., Paz, D.A., Maggese, M.C., Urbanski, H.F., 2005. GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae) revisited: a localization study with antibodies and riboprobes to GnRH-associated peptides. ***Cell Tissue Res.***321: 219–23.

Parhar, I., Iwata, M., Pfaff, D. & Schwanzel-Fukuda, M. 1995. Embryonic development of gonadotropin-releasing hormone neurons in the sockeye salmon. ***J Comp Neurol.*** 362:256-270.

Parhar IS, Sakuma Y.1999. Kallmann syndrome: a failure of GnRH neuronal migration. ***Nippon Ika Daigaku Zasshi.*** 66:220-221.

Parhar, I. 1997. GnRH in tilapia: Three genes, three origins and their roles. In: GnRH Neurons: Gene to Behavior. Brain Shuppan Publising, Tokyo, 99-122.

Parhar, I., Soga, T., Ishikawa, Y., Nagahama, Y. & Sakuma, Y. 1998. Neurons synthesizing gonadotropin-releasing hormone mRNA subtypes have multiple developmental origins in the medaka. ***J. Comp. Neurol.*** 41: 216-226.

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

Pawson, A. & McNeilly. 2005. The pituitary effects of GnRH. ***An. Reprod. Sci.*** 88: 75-94.

Pazos, A.J. & Mathieu, M., 1999. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. **Gen. Comp. Endocrinol.** 113, 112–120

Penlington, M., Williams, M., Sumpter, J., Rand-Weaver, M., Hoolo, D. & Arme, C. 1997. Isolation and characterization 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.

Peters, A. 2005. Veterinary clinical application of GnRH--questions of efficacy. **Anim Reprod Sci.** 88:155-67.

Powell, J., Zohar, Y., Elizur, A., Park, M., Fischer, W., Craig, A., Rivier, J., Lovejoy, D. & Serwood, N.1994. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. **Procc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91: 12081-12085.

Powell, J., Reska-Skinner, S., Prakash, M., Fischer, W., Park, M., Rivier, J., Craig, A., Mackie, G. & Sherwood, N. 1996. Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 93 :10461-10464.

Powell, J., Standen, E., Carolsfeld, J., Borella, M., Gazola, R., Fischer, W., Park, M., Craig, A., Warby, C., Rivier, J., Val-Sella, M. & Sherwood, N 1997. Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. **Regul Pept.**68:189-95.

Querat, B., Sellouk, A. & Salmon, C.2000. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) beta subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. **Biol Reprod.** 63:222-228.

Ramakrishappa, N., Rajamahendran R, Lin, Y. & Leung, P. 2005. GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. ***Anim Reprod Sci.*** 88(1-2):95-113.

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

Rispoli, L. & Nett, T. 2005. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: Structure, distribution and regulation of expression. ***Animal. Rep. Sci.*** 88: 57-74.b

Robison, R., White, R., Illing, N., Troskie, Morley, M., Miller, M. & Fernald, R. 2001. Gonadotropin-releasing hormone receptor in the teleost *Haplochromis burtoni*: structure, localization and function. ***Endocrinol.*** 142: 1737-1743.

Rodriguez-Gomez, F., Rendon, M., Sarasquete, C. & Munoz-Cueto J. 1999. Distribution of gonadotropin-releasing hormone immunoreactive systems in the brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. ***Histochem J.*** 31:695-703.

Ruf, F. & Seafon, S. 2004. Geomics view of gonadotrope signaling circuits. ***Trends Endocrinol Metab.*** 15: 331-338.

Scaggiante, M., Grober, M., Lorenzi, V. & Rasotto, M. 2006. Variability of GnRH secretion in two goby species with socially controlled alternative male mating tactics. ***Hormones & Behavior.*** En prensa.

Schwartz, N. & Levine, J. 2006. Ontogeny of Gonadotropin-releasing Hormone Neurons: Fishing for clues in medaka. ***Endocrinol.*** 147:1074-1075.

Schawanzel-Fukuda, M. & Paff,, D. 1989. Luteinizing hormone-releasing (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallman) syndrome. ***Mol Brain Res.*** 6:311-326.

Schneider, F., Tomek, W. & Gründker, C. 2006. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: A review. ***Therionenology.*** En prensa.

Sealfon, C., Weinstein, H. & Millar, R. 1997. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. **Endocrinol rev.** 18: 180-205.

Senthilkumaran, B., Okuzawa K., Gen, K., Kagawa, H. 1999. Distribution and seasonal variations in levels of the three native GnRHs in the brain and the pituitary of perciform fish. **J. Neurocrinol.** 11: 181-186.

Shacham, S., Cheifetz, MN., Lewy, H., Ashkenazi, IE., Becker, OM., Seger, R. & Naor, Z. 1999. Mechanism of GnRH receptor signaling: from the membrane to the nucleus. **Ann Endocrinol.** 60: 79-88.

Shacham, S., Harris, D., Ben-Shlomo, H., Bonfil, D., Przedeki, F., Ashkenazi, IE., Seger, R. & Naor, Z. 2001. Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs. **Vitam horm.** 63: 63-90.

Sherwood, N., Eiden, L., Brownstein, M., Spiess, J., Rivier, J. & Vale, W. 1983. Characterization of a teleost Gonadotropin-releasing hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 80: 2794-2798.

Sherwood, N., Grier, H., Warby, C., Peute, J. & Taylor, R. 1993. Gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, in snook *Centropomus undecimslis*, in comparison with forms in black sea bass *Centropristis striata*. **Regul. Pept.** 46: 523-534.

Sherwood, N., von Scharbulg, K. & Lescheid, D. 1997. Origin and evolution of GnRH in vertebrates and invertebrates. In parhar, I. & Sakuma, Y. GnRH Neurons. **Gene to behavior**, Brain, Shuppan, Tokio, pp 3-25.

Sherwood, N., Doroshov, S., Lance, V., 1991. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in bony fish that are phylogenetically ancient: redbfish (*Calamoichthys calabaricus*), sturgeon (*Acipenser transmontanus*), and alligator gar (*Lepisosteus spatula*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 84: 44-57.

Sherwood, N. & Wu, S. 2005. Developmental role of GnRH and PACAP in a zebrafish model. **Gen Comp Endocrinol.** 142:74-80.

Shimizu, M., & Bédécarrats, G. 2006. Identification of a Novel Pituitary-specific Chicken Gonadotropin-releasing Hormone Receptor and Its Splice Variants. ***Biol Reprod.*** En prensa.

Shower, S., Chiand, Y., Lovas, S. & Conlon, J. 1993. Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. ***Endocrinol.*** 132: 1125-1131.

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

Soga, T., Sakuma, Y. & Parhar, I. 1998. Testosterone differentially regulates expression of GnRH messenger RNAs in the terminal nerve, optic and midbrain of male tilapia. ***Mol. Brain. Res.*** 60: 13-20.

Somoza, G., Lescheid, D., Miranda, L., Lo Nostro, F., Magliulo-Cepriano, L., Montaner, A., Schreibman, M., Rivier, J. & Sherwood, N. 2002. Expression of pejerrey Gonadotropin-releasing hormone in three orders of fish. ***Biol. Reprod.*** 67: 1864-1871.

Somoza, G., Miranda, L., Strobl-Mazzulla, P. & Gastón, L. 2002. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH): From Fish to Mammalian Brains. ***Cellular and Molecular Neurobiology.*** 22: 589-609.

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

Taylor, J.S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A., Van de Peer, Y., 2003. Genome duplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish. ***Genome Res.*** 13: 382-390.

Tensen, C., Okuzawa, K., Blumenrohr, M., Rebers, F., Leurs, R., Bogerd, J., Schulz, R. & Goos, H. 1997. Distinct efficacies for two endogenous ligands on a single cognate gonadoliberein receptor. ***Eur J Biochem.*** 243:134-40.

Timpsmark, C., Weber, G., Strom, C., Grau, E., Hirano, T. & Borski, R. 2005. Involvement of Fosfolipase C and intracellular calcium signaling in the gonadotropin-releasing hormone regulation of prolactin release from lactotrophs of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 142: 227-233.

Tobet, S. & Schwarting, G. 2006. Minreview: Recent progress in a Gonadotropin-releasing hormone neuronal migration. **Endocrinol.** 147: 1159-1165.

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

Torgersen, J., Nourizadeh-Lillabadi, R., Husebye, H., Aleström, P., 2002. In silico and in situ characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) GnRH3 (sGnRH) gene. **BMC Genomics.** 3: 25–36.

Troskie, B., Illing, N., Rumbak, E., Sun, Y., Hapgood, J., Sealfon, S., Conclin, D. & Millar, R. 1998. Identification of three putative GnRH receptor subtypes in vertebrates. **Gen. Comp. Endocrinol.** 112: 296-302.

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

Tsai, P., Lunden, J., & Jones, J. 2003. Effects of steroid hormones on spermatogenesis and GnRH release in male Leopard frogs, *Rana pipiens*. **Gen Comp Endocrinol.** 134:330-8.

Tsutsumi, M., Zhou, W., Millar, R., Mellon, P., Roberts, J., Falagan, C., Dong, K., Gillo, B. & Sealfon, S. 1992. Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. **Mol. Endocrinol.** 6: 1163-1169.

Turkstra, J.A., Schaaper, W., Oonk, H. & Muelen, R. 2005. GnRH tandem peptides for inducing an immunogenic response to GnRH-I without cross-reactivity to other GnRH isoforms. **Vaccine.** 23: 4915-4920.

Uchida, H., Ogawa, S., Harada, M., Matsushita, M., Iwata, M., Yasuo Sakuma, Y. & Parhar I. 2005. The Olfactory Organ Modulates Gonadotropin-Releasing Hormone Types and Nest-Building Behavior in the Tilapia *Oreochromis niloticus*. **J. Neurobiol.** 61: 1-11.

Uzbekova S, Lareyre, J.J, Guiguen Y., Ferriere F., Bailhache T. & Breton. 2001. Expression of sGnRH in gonads during rainbow trout gametogenesis. **Comp Biochem Physiol.**129:457–465.

Van de Peer, Y., 2004. Tetraodon genome confirms Takifugu findings: most fish are ancient polyploids. **Genome Biol.** 5: 250.

Vetillard, A., Ferriere, F., Jegot, P. & Bailhache, T. 2006.Regulation of salmon Gonadotropin releasing Hormone gene expression by sex steroids in rainbow trout brain. **J Endocrinol.**18: 445-453.

Vickers, E., Laberge, F., Adams, B., Hara, T. & Sherwood N. 2004. Cloning and localization of three forms of gonadotropin-releasing hormone, including the novel whitefish form, in a salmonid, *Coregonus clupeaformis*. **Biol Reprod.** 70:1136-46.

von Schalburg, K., Harrower W. & Sherwood, N. 1999.Regulation expression of gonadotropin-releasing hormone in salmon embryo gonad. **Mol Cell Endocrinol.** 157: 41–54.

von Schalburg, K. & Sherwood, N. 1999. Regulation and expression of gonadotropin-gonadotropin releasing hormone gene differs in brain and gonads rainbow trout. **Endocrinol.**140: 3012–3024.

von Schalburg, K., Warby, C. & Sherwood, N. 1999. Evidence of gonadotropin-releasing hormone peptides in the ovary and testis of rainbow trout. **Biol. Reprod.** 60: 1338-1344.

Weber, G., Powell, J., Park, M., Fischer, W., Craig, A., Rivier, j., Nanakorn, U., Parhar, I., Ngamvongchon, S., Grau, E. & Sherwood, N. 1997. Evidence that gonadotropin-releasing hormone (GnRH) functions as a prolactin-releasing factor in a teleost fish (*Oreochromis*

mossambicus) and primary structures for three native GnRH molecules. **J. Endocrinol.** 155: 121-132.

Wetsel, W., Mellon, P., Weiner, R., & Negro-Vilar, A. 1991. Metabolism of pro-luteinizing hormone-releasing hormone in immortalized hypothalamic neurons. **Endocrinol.** 129:1584-95.

Wierman, M. Pawlowski, J., Allen, M., Xu, M., Linseman, D. & Nielsen-Preiss, S. 2004. Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone neuronal migration. **Endocrinol. Metabolism.** 15: 96-102.

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

White, R. & Fernald, R. 1998. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species. **Gen. Comp. Endocrinol.** 112:17–25.

Whitlock, K. 2004. Development of the Nervus Terminalis: Origin and migration. **Micros. Res. Tech.** 65: 2-12.

Whitlock, K. 2005. Origin and development of GnRH neurons. **Trends in Endocrinology and Metabolism.** 16: 145-151.

Whitlock, K., Illing, N., Brideau, N., Smith, K. & Twomey, S. 2006. Development of GnRH cells: Setting the stage for puberty. **Mol Cell Endocrinol.** 254-255: 39-50.

Whitlock, K. & Westerfield, M. 2000. The olfactory placode of the zebrafish from by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. **Develop.** 127: 3645-3653.

Whitlock, K., Wolf, C. & Boyce, M. 2003. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells arise from cranial neural crest and adenohypophysial regions of the neural plate in the zebrafish, *Danio rerio*. **Dev. Bio.** 257: 140-152.

Wirsig-Wiechmann, C. & Oka, Y. 2002. The terminal nerve ganglion cells project to the olfactory mucosa in the dwarf gourami. **Neurosci Res.** 44: 337-341.

Wittbrodt, J., Meyer, A., Schartl, M., 1998. More genes in fish? **BioEssays** 20, 511–515.

Wray, S., Grant, P. & Gainer, H. 1989. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 86:8132-6.

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

Yamamoto, N., Oka, Y., Amano, M., Aida, K., Hasegawa, Y. & Kawashima, S. 1995. Multiple gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive systems in the brain of the dwarf gourami, *Colisa lalia*: Immunohistochemistry and radioimmunoassay. **J. Comp. Neurol.** 355: 354-368.

Yaron, Z., Gur, G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Lehavi-Sivan, B. & Elizur, A. 2001. Regulation of gonadotropin subunit genes in tilapia. **Comp. Biochem. Physiol. Part B.** 129: 489-502.

Yaron, Z. & Lehavi-Sivan, B. 1990. Intracellular events associated with GnRH and dopamine effects on GTH secretion in tilapia. In: Eppler A. Scanes, C. G. Stetson, M.H. (Eds), *Progress in Comparative Endocrinology*. Wiley-Liss, New-York, pp. 409-502.

Yoo, M., Kang, H., Choi, H., Kim, J., Troskie, B., Millar, R., Kwon, H. 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., Sherwood, N. & Peter R. 1998. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). **Peptides.** 9:625-630.

Yu, K., Lin, X., Bastos, J. & Peter, R.1997. GnRH Neurons: **Gene to Behaviour**. Cap.12.

Zandbergen, M. A., Kah O., Bogerd, J., Peute, J., Goos, H.J.1995.Expression and distribution of two gonadotropin-releasing hormones in the catfish brain. **Neuroendocrinol**.62:571-8.

Zhang, L., Wayne, N., Sherwood, N., Postigo, H. & Tsai, P.2000.Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an opisthobranch mollusk, *Aplysia californica*. **Gen Comp Endocrinol**. 118:77-89.

Zohar, Y. & Mylonas, C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**. 197: 99-136.

Zmora, N., 2002. The GnRH system in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **J. Endocrinol**. 172: 105-116.