



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“DISTRIBUCIÓN DE LA HORMONA LIBERADORA DE
GONADOTROPINAS DE SALMÓN (sGnRH) EN EL CEREBRO
ANTERIOR DE *Chirostoma humboldtianum*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MÓNICA CHÁVEZ MALDONADO

TUTOR: Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas

COMITÉ TUTORAL: Dra. Lucia Eliana Rangel Porta

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

Cuautitlán Izcalli Estado de México

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme distinguido al otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al proyecto de CONACYT 52703

Al proyecto del PAPCA 2007.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de realizar estudios de posgrado y albergarme durante este tiempo.

A los académicos del posgrado de la FES-C por compartirme su conocimiento infinitas gracias.

Al Dr. Rodolfo Cárdenas por su amistad, sus comentarios, sugerencias y también por compartir su conocimiento conmigo muchas gracias.

A la Dra. Lucia Eliana Rangel Porta y al Dr. Carlos Gerardo García Tovar por también concederme mucho de su conocimiento muchas gracias.

A los miembros del jurado por sus sugerencias para el mejoramiento de la presente.

Al Maestro Jorge Gersenowies por su ayuda muchas gracias.

DEDICATORIAS.

A mis invencibles y preciosos
Viridiana, Omar Mauricio y César Alberto.

A Pablo César

A mi mamá preciosa Ana María

A mis hermanas Cata, Rosario en especial a la que esta muy
lejos físicamente Lucy pero muy cerca de mi corazón.

A mis preciosos sobrinos y sobrinas

Y a D. P por darme todos los elementos para conseguir mis
metas.

A mis amigos de hace muchísimo tiempo

A mi amiga Bety por las largas charlas.

A Mariano, Lupita, Eve Lyn, Miriam, Salvador mis amigos del
posgrado

CONTENIDO

I. RESUMEN.....	1
I ABSTRACT.....	2
II. INTRODUCCION.....	3
A. ASPECTOS GENERALES.....	3
1.- HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS...	3
B. ANTECEDENTES.....	6
1.- DISTRIBUCIÓN DE LOS SISTEMAS GnRH.....	6
2.- FORMAS MOLECULARES DE GnRH.....	9
3.- MECANISMO DE SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS.	11
4.- RECEPTORES A GnRH.....	12
5.- EL ENCÉFALO Y LA HIPÓFISIS DE LOS TELEÓSTEOS	16
6.- CONSIDERACIONES DE LA ESPECIE EN ESTUDIO...	25
C. JUSTIFICACIÓN.....	28
III. OBJETIVOS	
1.-OBJETIVO GENERAL.....	30
2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
IV. HIPÓTESIS.....	31
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
1.- COLECCIÓN DEL TEJIDO.....	32
2.- PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.....	32
3.- INMUNOHISTOQUÍMICA.....	34
VI. RESULTADOS.....	35
VII. DISCUSIÓN.....	39

VIII. CONCLUSIONES.....	45
IX. LITERATURA CITADA.....	47

I. RESUMEN

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) cuenta a la fecha con 14 isoformas reportadas entre los vertebrados, teniendo un papel importante en el control de las funciones reproductivas, además de que desempeña papeles de neurotransmisor/neuromodulador en el sistema nervioso central de estos organismos. En estos, se pueden presentar dos o hasta tres isoformas de la hormona en el sistema nervioso del organismo, por ello, es importante establecer que isoforma se presenta en regiones específicas del cerebro. En los peces óseos o teleósteos, la GnRH es sintetizada en células del hipotálamo, en el área preóptica (APO), mismas que envían fibras nerviosas que contienen vesículas con la hormona, está es liberada directamente en la adenohipófisis. En este trabajo se estableció la distribución de sGnRH en el cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*, para ello, se obtuvieron encéfalos de ejemplares de dicha especie, mismos que se fijaron y procesaron por la técnica histológica de rutina y se les realizó la técnica inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-sGAP. La hormona fue detectada en el cerebro anterior, específicamente en el núcleo preóptico periventricular y el núcleo preóptico magnocelular. También se presentaron fibras inmunoreactivas en la región del hipotálamo y el área preóptica ventral que se dirigían a la adenohipófisis. De acuerdo con diversos estudios de la distribución de la GnRH en otras especies de teleósteos, en los cuales se constata la presencia de esta en el área preóptica, esta forma de GnRH parece ser la que actúa promoviendo la secreción de gonadotropinas en la hipófisis al realizar un papel neuroendocrino. Se concluye que la distribución de sGnRH en esta especie de pez mexicano es en el cerebro anterior, específicamente, en el núcleo preóptico periventricular, el núcleo preóptico magnocelular y en la hipófisis la cual concuerda con la reportada para otras especies de teleósteos.

Palabras Clave: GnRH, gonadotropinas, inmunohistoquímica, *Chirostoma humboldtianum*, encéfalo..

I. Abstract

The releasing hormone of gonadotropins (GnRH) to the date has 14 isoforms reported between the vertebrates. This hormone has an important paper in the control of the reproductive functions and besides it plays roles of neuromodulador/neurotransmitter in the central nervous system of these organisms. There are two or up to three isoforms of hormone in the nervous system of the organism. For this reason, it is important to establishment which isoform appears in specific regions of the brain. In the bony or teleost fish, the GnRH is synthesized in cells of the hypothalamus, in the area preoptical (APO), those neurons that directly send fibers that contain vesicles with the hormone, which in turn, it's releasing directly into the adenohipofisis. In this work the distribution of sGnRH in the anterior brain of *Chirostoma humboldtianum*. Brains were obtained, fixed and processed by the histological technique of routine and immunohistochemistry was made to them with an antibody anti-sGAP. The hormone was detected in the anterior brain, specifically, in the *nucleus preopticus periventricularis* and the *nucleus preopticus magnocelularis*. Also, immunoreactive fibers in the region of the hypothalamus and the ventral preoptical area seem to reach the adenohipofisis. According with previous reports of the distribution of the GnRH in other species of teleosts, the presence of this isoform in the preoptical area is stated, this isoform of GnRH seems to be the one that acts on gonadotrophins release in the pituitary. In conclusion the distribution of sGnRH in this species of Mexican fish is in the anterior brain, specifically, in the *nucleus preopticus periventricularis*, the *nucleus preopticus magnocelularis* and in the pituitary which agrees with the reported one for other species of teleosts.

Key words: GnRH, gonadotropins, immunohistochemistry, *Chirostoma humboldtianum*, brain.

II. INTRODUCCIÓN.

A. ASPECTOS GENERALES

Desde el aislamiento de la primera isoforma de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) del cerebro de cerdos y ovejas en 1971 (Matsuo *et al*, 1971, Amoss *et al*, 1971), este neuropéptido ha sido identificado en otros mamíferos, en otros vertebrados e inclusive en invertebrados (Lethimonier *et al.*, 2004). El nombre original del péptido fue hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y hacía referencia a sus efectos estimulantes en la liberación de la hormona luteinizante (LH). Ahora se sabe que esta neurohormona también estimula la liberación de FSH (Barry y Dubois, 1974; Leonardelli *et al.*, 1973, Dubois *et al*, 2002). Es a través de la inducción de la biosíntesis y liberación de las gonadotropinas LH y FSH de la hipófisis, que la GnRH estimula de manera indirecta la gametogénesis y la producción de esteroides sexuales, por ello, es considerado que la GnRH tiene un papel importante en el control de las funciones reproductivas en todos los vertebrados (Chen y Fernald, 2008).

Los peces óseos no presentan un sistema porta hipotálamo-hipofisiario, la GnRH es sintetizada en células del hipotálamo y del área preóptica (APO), mismas que envían fibras nerviosas que contienen vesículas con la GnRH, innervando directamente la hipófisis anterior, donde esta hormona se une a receptores específicos de alta afinidad (GnRH-R) (Yaron *et al*, 2001, Yamamoto, 2003).

La familia de hormonas GnRHs se ha expandido y actualmente incluye 24 isoformas, 14 entre las especies de vertebrados y 10 en invertebrados (cuadro 1). Estos péptidos tienen algunas características en común: todos son deca péptidos (excepto por la GnRH de *Octopus* que presenta 12 aminoácidos), con residuos en los péptidos 1, 4, 9 y 10 perfectamente conservados y con modificaciones en sus extremos, el amino se trata de un piroglutamil y el carboxilo terminal está aminado (Iwakoshi *et al*, 2002, Gorman y Sower, 2003). En la nomenclatura tradicional de esta familia de hormonas, a cada isoforma se le antepone la letra inicial del organismo donde fue identificada primero (Somoza *et al.*, 2002; Gorbman y Sower, 2003; Lethimonier *et al.*, 2004, Tsai, 2005; Guilgur *et al.*, 2006). Del total de las isoformas, 8 de ellas están

presentes en el cerebro de los diferentes peces teleósteos, 2 de las cuales fueron originalmente descritas en otro vertebrado y son: la GnRH de mamífero (mGnRH, Matsuo *et al*, 1971, Amoss *et al*, 1971), y la GnRH de pollo II (cGnRH-II, Miyamoto *et al*, 1984). Las otras seis han sido aisladas de teleósteos y son: GnRH de salmón (sGnRH, Sherwood, *et al*, 1983), GnRH de lúbina (sbGnRH, Powell, *et al*, 1994), GnRH de bagre (cfGnRH, Ngamvongchon, *et al*, 1992), GnRH de arenque (hrGnRH, Carolsfeld, *et al*, 2000), GnRH de pez blanco (wfGnRH, Adams, *et al*, 2002), GnRH de medaka (mdGnRH, Okubo, *et al*, 2000) o pejerrey (pjGnRH, Montaner, *et al*, 2001c).

Los salmónidos incluyen el pez blanco, el salmón y la trucha (Smith y Stearley, 1989), y en ellos el péptido GnRH está bien identificado en nueve especies por la estructura primaria del cDNA o la secuencia del gene (Adams *et al*, 2002). En algunos salmónidos (salmón y trucha) solo dos formas de GnRH se han identificado sGnRH y cGnRH-II. Existen otras especies de peces teleósteos que expresan también solo dos formas GnRH y que incluyen al bagre (Ngamvongchon *et al*, 1992), el pez dorado (Yu *et al*, 1988; Lin y Peter, 1996), la perca (Penlington *et al*, 1997) y el pez cebra (Powell *et al*, 1996).

En otro grupo de salmónidos, una tercera forma parecía estar presente pero no había sido identificada con antisueros. Adams *et al*, en 2002, identificaron la tercera forma en el pez blanco (wfGnRH). Se ha encontrado un tercer gene de GnRH en otras especies de peces no salmónidos, mismo que puede expresarse en áreas del cerebro asociadas con el control de las gonadotropinas de la hipófisis. En teleósteos las neuronas de sGnRH están usualmente asociadas con la región del nervio terminal olfatorio y las neuronas cGnRH-II están presentes en el cerebro medio, mientras que la tercera forma de GnRH se ubica usualmente en las neuronas del telencéfalo ventral y la región preóptica (White *et al*, 1995).

Cuadro 1. Estructura de las 24 isoformas de GnRH en vertebrados e invertebrados. GnRH de mamífero (mGnRH), GnRH de conejillo de indias (gpGnRH), GnRH de pollo I (cGnRH-I), GnRH de rana (frGnRH), GnRH de lubina (sbGnRH), GnRH de salmón (sGnRH), GnRH de medaka (mdGnRH), GnRH de bagre (cfGnRH), GnRH de arenque (hrGnRH), GnRH de pez blanco (wfGnRH), GnRH de pez perro (dfGnRH), GnRH de pollo II (cGnRH-II), GnRH de lamprea I-III (IGnRH), GnRH de tunicado I-VIII (tGnRH), GnRH de pulpo (oGnRH) (Modificado de Somoza *et al.*, 2002; Gorbman y Sower, 2003; Lethimonier *et al.*, 2004, Tsai, 2005; Sherwood y Adams, 2005; Guilgur *et al.*, 2006).

Isoforma GnRH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mGnRH	Pglu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH2
gpGnRH	*	Tyr	*	*	*	*	Val	*	*	*
cGnRH-I	*	*	*	*	His	*	Trp	Gln	*	*
frGnRH	*	*	*	*	*	*	*	Trp	*	*
sbGnRH	*	*	*	*	*	*	*	Ser	*	*
sGnRH	*	*	*	*	*	*	Trp	Leu	*	*
mdGnRH	*	*	*	*	Phe	*	*	Ser	*	*
cfGnRH	*	*	*	*	His	*	*	Pro	*	*
hrGnRH	*	*	*	*	His	*	*	Ser	*	*
wfGnRH	*	*	*	*	*	*	Met	Asn	*	*
dfGnRH	*	*	*	*	His	*	Trp	Leu	*	*
cGnRH-II	*	*	*	*	His	*	Trp	Tyr	*	*
IGnRH-III	*	*	*	*	His	Asp	Trp	Lys	*	*
IGnRH-I	*	*	Tyr	*	Leu	Glu	Trp	Lys	*	*
tGnRH-I	*	*	*	*	Asp	Tyr	Phe	Lys	*	*
tGnRH-II	*	*	*	*	Leu	Cys	His	Ala	*	*
tGnRH-III	*	*	*	*	*	Glu	Phe	Met	*	*
tGnRH-IV	*	*	*	*	Asn	Gln	*	Thr	*	*
tGnRH-V	*	*	*	*	*	Glu	Tyr	Met	*	*
tGnRH-VI	*	*	*	*	Lys	*	Tyr	Ser	*	*
tGnRH-VII	*	*	*	*	*	Ala	*	Ser	*	*
tGnRH-VIII	*	*	*	*	Leu	Ala	*	Ser	*	*
tGnRH-IX	*	*	*	*	Asn	Lys	*	Ala	*	*
oGnRH	*	Asn Tyr	Phe	*	Asn	*	Trp	His	*	*

B. ANTECEDENTES

1.- DISTRIBUCIÓN DE LOS SISTEMAS GnRH

Una primera nomenclatura de las GnRHs fue nombrando a las isoformas de GnRH acorde a la primera especie en la cual fue encontrada la secuencia. Sin embargo, esta denominación no provee información filogenética, fisiológica o de algún otro tipo. La presencia de más de una isoforma de GnRH en el encéfalo de los vertebrados hizo evidente que se requería de una nueva manera de agrupar a las GnRHs. Basada en esta idea y en un análisis filogenético que demostró la existencia de tres formas paralogas de GnRH en el linaje de los vertebrados. (Muske, 1993; Okubo y Nagahama, 2008), una nueva nomenclatura ha sido sugerida para las formas moleculares de GnRH, en donde las tres formas paralogas son simplemente llamadas GnRH1, GnRH2 y GnRH3 (White *et al*, 1998; Fernald y White, 1999). Bajo esta nomenclatura, la forma de GnRH-II de pollo (cGnRH-II), y GnRH de salmón (sGnRH) son llamadas GnRH2 y GnRH3 respectivamente, y las otras formas de GnRH, que incluyen; la de mamífero (mGnRH), la del conejillo de indias (gpGnRH), la GnRH-I de pollo (cGnRH-I), la de rana (frGnRH), la de bagre (cfGnRH), la de lubina (sbGnRH), la de arenque (hrGnRH), la de medaka (mdGnRH) y la del pez blanco (wfGnRH) son llamadas GnRH1 (Okubo y Nagahama, 2008) (Figura 1).

En peces teleósteos, la distribución de las neuronas productoras de GnRH ha permitido sugerir la existencia de tres sistemas principales en el encéfalo: un sistema GnRH 1, ubicado a lo largo de la porción ventral del cerebro anterior (telencéfalo ventral, área preóptica e hipotálamo), que expresa distintas formas de GnRH según las especies (sGnRH, mGnRH, cfGnRH, sbGnRH, hrGnRH, mdGnRH); el sistema GnRH 2, ubicado en el cerebro medio y que expresa de forma conservada la cGnRH-II (Goos *et al*, 1985., Kah *et al*, 1986., Senthilkumaran *et al*, 1999; Subheader y Rama Krishna, 1988., Batten *et al*, 1990., Kah *et al*., 1991., Yamamoto *et al*, 1995., Rodríguez-Gómez *et al*, 1999). Además del sistema GnRH 3, que esta solo presente en este grupo de organismos, cuyas neuronas expresan sGnRH, y que se encuentra en el nervio terminal, con proyecciones a través del cerebro, el cual parece tener un papel neuromodulador. (Figura 2) (Hofmann, 2006; Okubo y Nagahama, 2008).

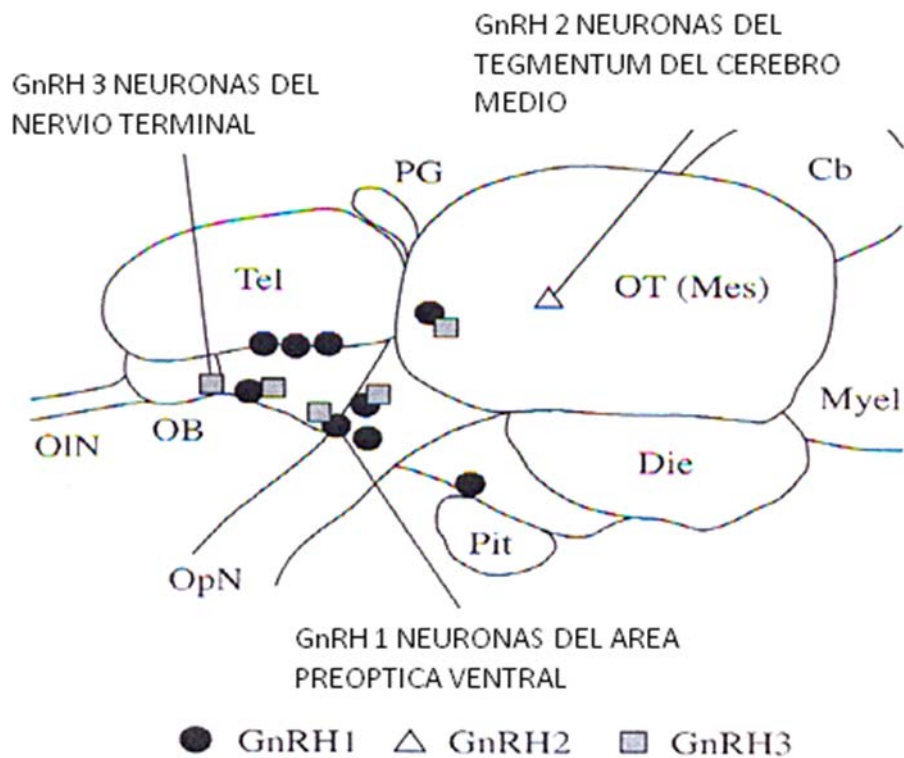


Figura. 1. Distribución de las neuronas que expresan GnRH en el cerebro de una especie de pez teleosteo, medaka, que posee las tres formas GnRH, la población de neuronas que expresan GnRH1 y GnRH3 están presentes en el cerebro anterior, las neuronas que expresan GnRH2 están exclusivamente en el tegmentum del cerebro medio. Cb cerebelo; Die, diencéfalo; Mes, mesencéfalo; Myel, mielencéfalo; OB, bulbo olfatorio; OIN, nervio olfatorio; OpN, nervio óptico; OT, tectum óptico; PG, glándula pineal; Pit, pituitaria (hipófisis); Tel, telencéfalo. (Modificado de Okubo y Nagahama, 2008).

La GnRH1 es la principal forma presente en la hipófisis y es aparentemente la responsable de regular el sistema reproductivo al estimular las gonadotropinas (Okubo y Nagahama, 2008). El papel fisiológico de GnRH2 aun no es claro, la proyección de neuronas GnRH2 a través del cerebro medio implica que actúa como neuromodulador, también se propone que está involucrada en la regulación del comportamiento reproductivo, en el consumo de comida y el balance de la energía (Temple *et al*, 2003). En la tilapia *Oreochromis niloticus* GnRH3 parece estar implicada en el control del comportamiento reproductivo, en el anidamiento y en el comportamiento agresivo (Ogawa *et al*, 2006). White *et al* (1995) proponen que GnRH3 en el ganglio del nervio terminal puede funcionar en el sistema olfatorio y visual para coordinar impulsos sensoriales con requerimientos reproductivos gracias a que las neuronas GnRH del nervio terminal de los teleosteos se proyectan a los nervios olfatorio y óptico. Además

GnRH3 en el nervio terminal es capaz de influenciar el procesamiento de la señal en la retina en el pez dorado y en cíclidos (White *et al*, 1995; Behrens *et al*, 1993, Grens *et al*, 2005). Sin embargo, la existencia de algunas fibras conteniendo GnRH3 en la hipófisis de la lubina dan a entender que está ligada a GnRH1, así la GnRH3 (probablemente producida en el área preóptica, pero no en el ganglio del nervio terminal) actúa como un factor hipofisiotrópico (González- Martínez *et al*, 2002a).

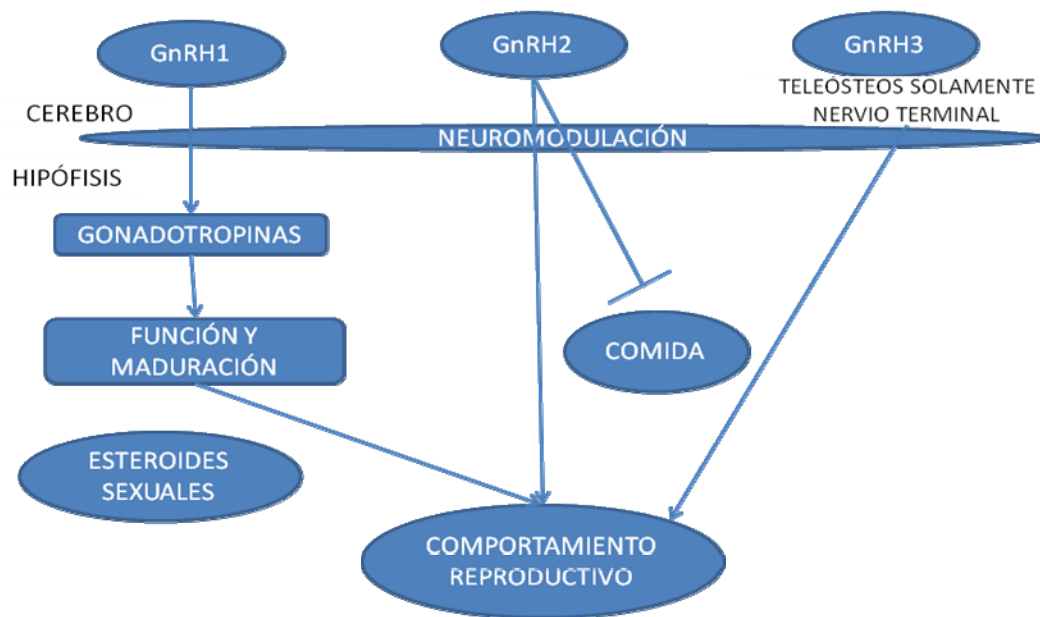


Figura. 2 Los tres subtipos de GnRH influyen el comportamiento reproductivo a través de vías hormonal y neuromoduladora, GnRH 1 principalmente controla la maduración gonadal a través de la liberación de gonadotropinas de la hipófisis, probablemente con función neuromoduladora en el cerebro. Ambas GnRH 2 y GnRH 3 influyen la reproducción y probablemente el comportamiento reproductivo a través de acciones neuromoduladoras en el sistema nervioso central. (Modificado de Hofmann, 2006).

2.- FORMAS MOLECULARES DE GnRH

La clonación molecular de cDNAs y genes que codifican las GnRHs de una variedad de especies de vertebrados, ha revelado que su organización está bien conservada en todas las formas. Cada forma de GnRH es codificada por un gene como parte de un polipéptido precursor terminal conocido como preproGnRH.

PreproGnRH consiste de un péptido señal (de 20-25 residuos de aminoácidos), el decapeptido GnRH seguido de un sitio de procesamiento proteolítico (Gly-Lys-Arg), y otro péptido asociado a GnRH (de 40-50 residuos de aminoácidos de largo) y conocido como GAP (GnRH-associated peptide por sus siglas en inglés) (Figura3) (Adelman *et al*, 1986, Okubo y Nagahama, 2008).

La función fisiológica del GAP aun no es clara y el alto grado de diversidad en la secuencia del péptido GAP muestra que no tiene una función conservada. Cada gene de GnRH tiene cuatro exones (denominados como exones 1, 2, 3 y 4) y tres intrones. El exón 1 codifica para la región 5' sin traducir (5'-UTR); el exón 2 codifica el N-terminal del polipéptido prepro-GnRH, incluyendo el péptido señal, el decapeptido GnRH, un sitio Gly-Lys-Arg y el N-terminal del GAP. El exón 3 codifica la porción media del GAP y el exón 4 codifica el C-terminal del GAP y la región 3' sin traducir (3'-UTR) (Okubo y Nagahama, 2008).

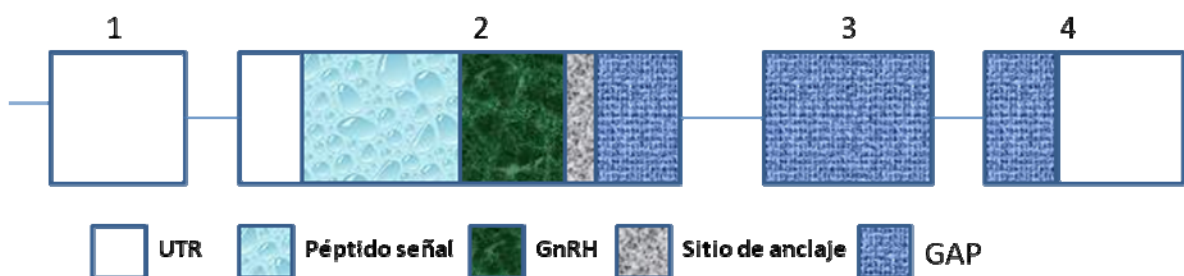


Figura. 3. Diagrama que ilustra la organización del gene de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH en vertebrados está compuesto de cuatro exones y tres intrones. Las cajas representan los exones y las líneas adyacentes a los exones representan los intrones . GnRH es codificada como parte de un polipéptido precursor llamado preproGnRH que consiste de un péptido señal, el decapeptido GnRH , el sitio de anclaje (Gly-Lys-Arg) y el péptido asociado a GnRH (GAP). UTR la región sin traducir. (Modificado de Okubo y Nagahama , 2008).

Las secuencias del GAP representan herramientas valiosas para las técnicas de hibridación *in situ* porque son más largas comparadas con las secuencias de GnRH (Figura 4) y hay una identidad más baja entre las secuencias del GAP (Figura 5) (González-Martínez *et al*, 2001, Guilgur, 2008).

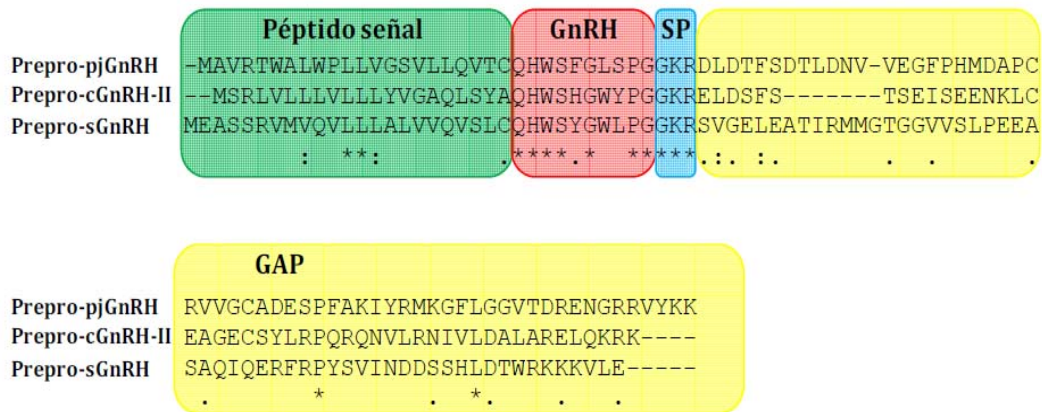


Figura 4. Alineamiento de los tres prepro-GnRHs presentes en pejerrey. Se observa que la secuencia de los GAPs presenta una baja similitud de secuencia entre los tres precursores, en comparación con la homología observable entre los GnRHs (Modificado de Guilgur, 2008).

%	sGAP	pjGAP	cIIGAP
sGAP		16,1	12
pjGAP	16,1		14
cIIGAP	12	14	

Figura 5. Porcentaje de similitud entre las secuencias correspondientes a los GAPs de los tres prepro-GnRHs presentes en el pejerrey (Modificado de Guilgur, 2008).

3.- MECANISMO DE SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS

En las gonadotropas de la hipófisis, la interacción de la GnRH con su receptor desencadena una cascada de reacciones intracelulares que se inicia con la activación de la proteína G. Un sistema de transducción mayor es a través de fosfolipasa C y se genera inositol 1, 4,5-trifosfato y diacilglicerol, liberación de calcio y activación de proteína quinasa C, respectivamente, que estimulan la síntesis y secreción de las gonadotropinas FSH y LH. (Anderson, 1996; Maudsley *et al*, 2004; Ruf y Sealton, 2004; Kah *et al*, 2007) (Figura 6).

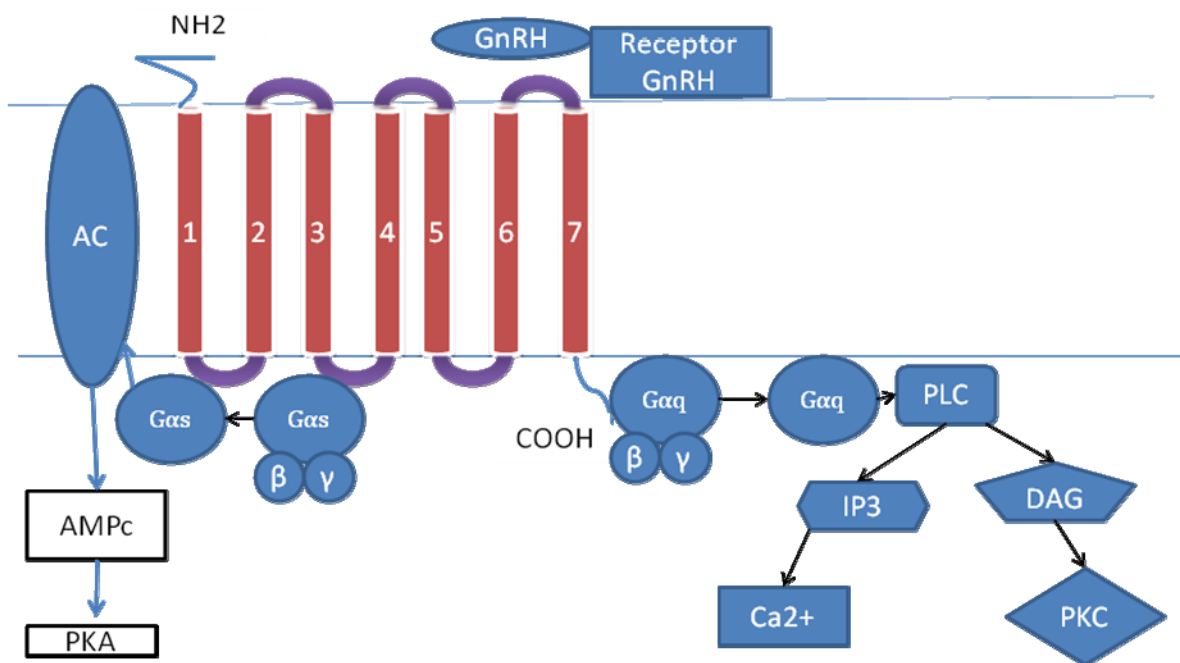


Figura 6. Receptor a GnRH. Abreviaciones; AC=adenilato ciclasa, GnRH= hormona liberadora de gonadotropinas, Gα= subunidad alfa de la proteína G, PKA= proteína cinasa A, PLC=fosfolipasa C, IP3= inositol trifosfato, DAG= diacil glicerol, PKC= proteína cinasa C, Ca2+= calcio.

Aunque los primeros receptores de GnRH se identificaron en la hipófisis, y hoy resulta evidente que también se expresan en tejidos extrahipofisarios, especialmente en el cerebro y las gónadas, reforzando la idea de que estos deca péptidos no sólo ejercen acciones neuroendocrinas a nivel de la hipófisis, sino que pueden actuar como neurotransmisores y/o neuromoduladores en el cerebro, y como factores paracrinós en las gónadas (Marshall *et al.*, 1976; Habibi *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1998).

4.- RECEPTORES A GnRH

En 1997, Tensen y colaboradores documentaron el primer receptor no-mamífero a GnRH, que fue clonado en bagre (Tensen, *et al* 1997; Kah *et al*, 2007). Los receptores a GnRH pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Figura 7), que se caracterizan por poseer siete dominios transmembranales hidrofóbicos y una alfa hélice unida por asas hidrofílicas extra e intracelulares. Los dominios extracelulares y las regiones superficiales de los dominios transmembranales son típicamente responsables de los eventos de unión, especialmente la tercer asa extracelular (EC3) (Karnik *et al*, 2003; Millar *et al*, 2004).

Estos receptores solo tienen un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal citoplasmático. Las asas intracelular y el C-terminal median las funciones de señalización de la transducción, la unión a la proteína G, la propagación de los eventos de señalización, y la desensibilización e internalización de los receptores de GnRH (Millar *et al*, 2004; Levavi-Sivan y Avitan, 2005; Blomenrohr *et al*, 1999). Diferentes formas de receptores a GnRH (GnRH-Rs) han sido clonados y caracterizados en los vertebrados y ligados a las múltiples formas de GnRH (Chin *et al*, 1993; Flanagan *et al*, 2007; Chen y Fernald, 2008).

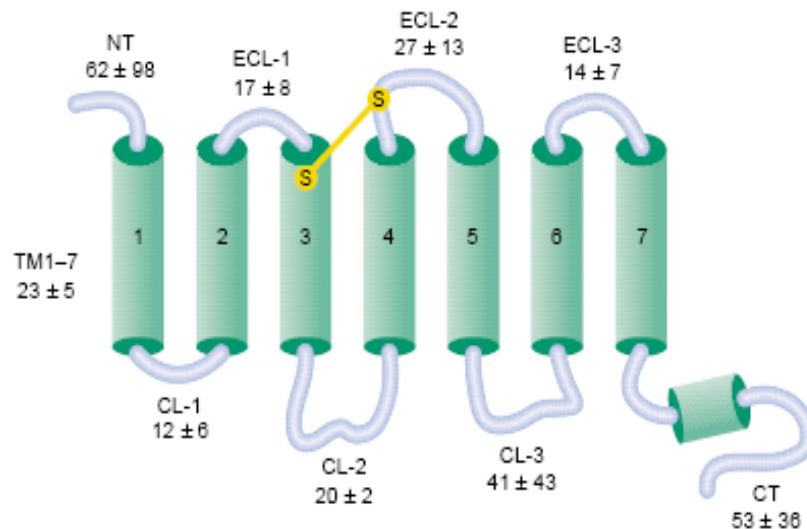


Fig. 7. Estructura del receptor a GnRH. Los receptores a GnRH pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), se caracterizan por siete dominios transmembranales hidrofóbicos alfa hélice unidos por asas hidrofílicas extra e intracelulares. Los dominios extracelulares y las regiones superficiales de los dominios transmembranales son típicamente responsables de los eventos de unión, especialmente la tercer asa extracelular (ECL-3), (Modificado de Karnik *et al*, 2003).

Las relaciones filogenéticas no son directas entre los receptores a GnRH y la nomenclatura es confusa. Al contrario de las claras relaciones filogenéticas de los tres ligandos GnRH, los receptores a GnRH parecen tener un pasado evolutivo más complejo. Previamente algunos autores agrupan a todos los receptores en tres clases, y postulan que se unen a ligandos particulares por su organización genética y la estructura del C-terminal (Tsutsumi *et al*, 1992; Millar *et al*, 2004; Chen y Fernald, 2008).

En otro esquema, dos principales grupos de receptores a GnRH fueron identificados basados en el tamaño del C-terminal, sugiriendo esto que los receptores a GnRH presentan diferentes cascadas de transducción y tendencia para el progresivo acortamiento del C-Terminal, con lo cual modulan la desensibilización o internalización de los receptores a GnRH (Guilgur *et al*, 2006). Un análisis filogenético y estructural sugiere que los receptores a GnRH (GnRH-Rs) pueden ser clasificados en cuatro subfamilias: a1, a2, b1 y b2. Flanagan *et al*, (2007) propone dos grupos principales de receptores a GnRH (GnRH-Ra y Rb) basado en las relaciones filogenéticas de la secuencia de la región que codifica para GnRH-Rs, la comparación sistemática de la estructura de los GnRH-Rs está basada no solamente en el hecho de la conservación del

dominio EC3 en las cuatro subfamilias, sino también en el tamaño del C-terminal. Generalmente GnRH-Ra tiene un tallo C-terminal corto diferente de GnRH-Rb. (Flanagan *et al*, 2007). Los patrones filogenéticos de GnRH-Ra se dividen en el grupo a1 (no-mamíferos), el grupo a2 (de mamíferos), el grupo b GnRH-Rb1 que solo es encontrado en tetrápodos y el grupo b2 que se ha encontrado solo en no-mamíferos. (Figura 8), (Troskie *et al*, 2000; Chen y Fernald, 2008). El C-terminal puede influir en los mecanismos de la trasducción de la señal, así como en la eficiencia del acoplamiento a los efectores río abajo en la vía de señalización y en la desensibilización e internalización del receptor (Levavi-Sivan y Avitan 2005; McArdle *et al* 2002). El C-terminal de GnRH-Ra1 contiene entre 36 y 61 aminoácidos. El tallo de GnRH-Rb1 incluye dos grupos: el de tallo C-terminal corto consiste de 50 aminoácidos y el de tallo C-terminal largo que consiste de 75 aminoácidos. GnRH-Rb2 tiene el C-terminal largo que contiene entre 67 y 91 aminoácidos. El grupo GnRH-Ra2 muestra fuerte preferencia por la $G_{q/11}$ - ligada a la señalización de la proteína quinasa C, pero no GnRH-Rb (Levavi-Sivan y Avitan, 2005).

Generalmente, las cuatro subfamilias de los receptores a GnRH pueden unirse con los tres ligandos GnRH y todos presentan especialmente alta afinidad a GnRH2. Por ejemplo GnRH-Ra1 tiene alta afinidad de unión y alta selectividad para el ligando GnRH2, está bien identificado en tetrápodos con alta afinidad y selectividad para GnRH2, especialmente en los primates, este subtipo se ha perdido en los roedores y no es funcional en humanos (Millar, 2003). Mientras que GnRH-Rb2 tiene alta afinidad de unión a GnRH2 y GnRH3, pero baja selectividad al ligando solamente se ha identificado en mamíferos y específicamente tiene alta afinidad y especificidad para GnRH1 (Millar *et al*, 2004). La expresión de GnRH-R está relacionada con la innervación de GnRH; Por ejemplo, la distribución de GnRH-Ra1 y Rb2 es a través del cerebro de los teleósteos (Madigou *et al*, 2000; Chen y Fernald, 2006; Chen y Fernald, 2008).

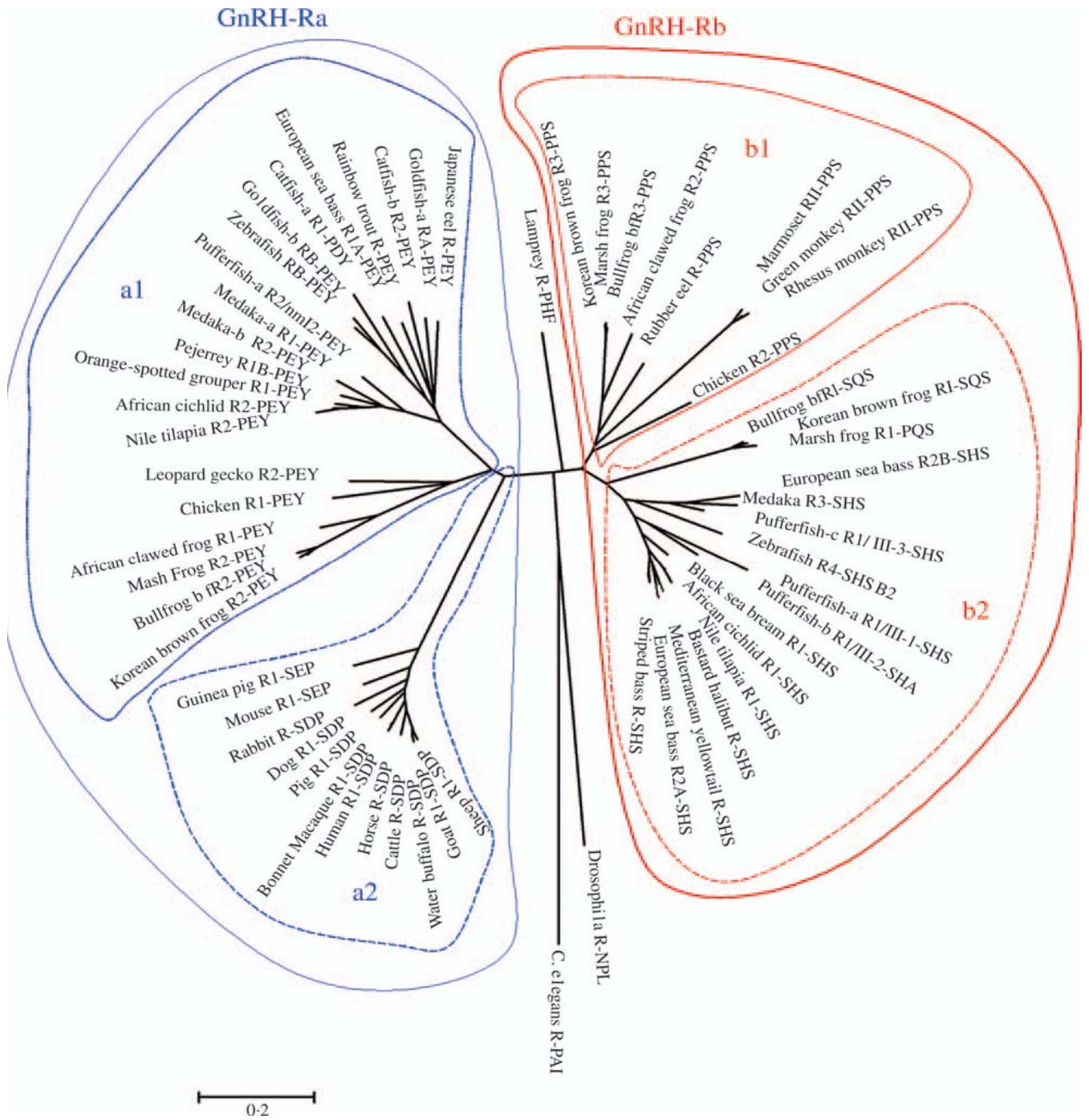


Figura 8. Árbol filogenético del vecino más cercano de GnRH, basada en la secuencia de aminoácidos de 75 taxa (Modificado de Chen y Fernald, 2008).

5.- EL ENCÉFALO Y LA HIPÓFISIS DE LOS TELEÓSTEOS EL CEREBRO

Una sencilla definición del cerebro lo identificaría como la parte anterior del tubo neural que se encuentra dentro del cráneo. Sin embargo, la morfogénesis del cerebro de los vertebrados es mucho más compleja en su forma anatómica y su organización interna. El tubo cerebral primario se divide originalmente en un prosencéfalo anterior (arquencéfalo) y un deuteroencéfalo posterior. Después, el cerebro pasa a una etapa triple que consta al frente del prosencéfalo original (cerebro anterior), al medio el mesencéfalo (cerebro medio) y en la parte posterior el rombencéfalo (cerebro posterior).

Para los vertebrados en general, la nueva historia embrionaria del cerebro es la que comprende varios procesos de formación. Una de las primeras modificaciones consiste en la subdivisión de dos de las tres regiones primarias del cerebro. El mesencéfalo permanece intacto, pero el prosencéfalo se diferencia en telencéfalo (anterior) y diencefalo (posterior), mientras que el rombencéfalo se convierte en metencéfalo y mielencéfalo.

En los peces, las cinco divisiones del cerebro están esencialmente distribuidas en línea recta (Torrey, 1978) (Figura 9 y 10).

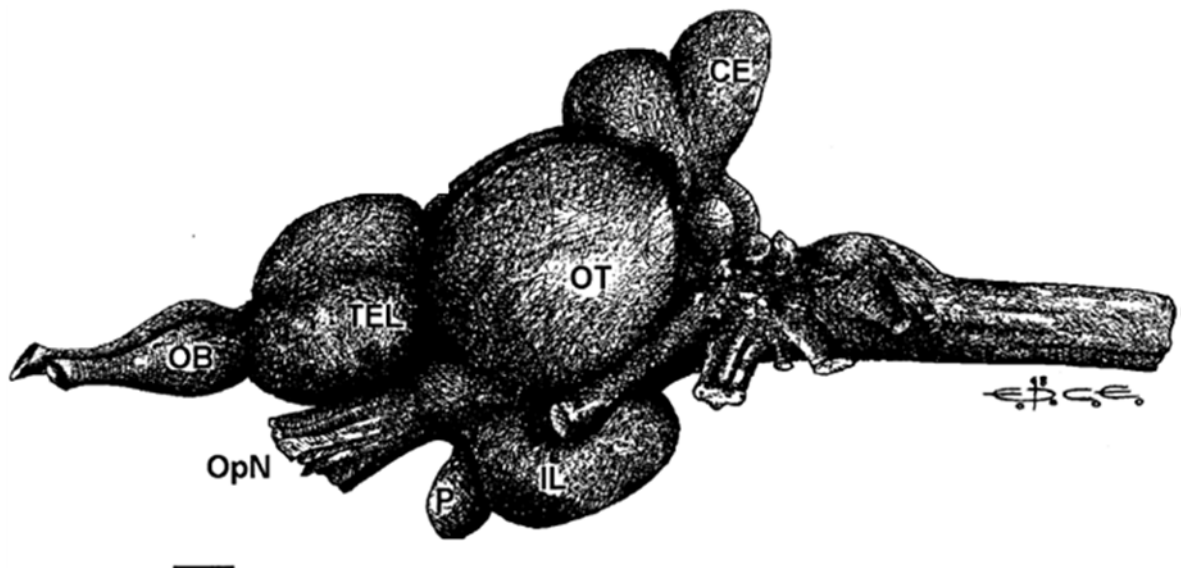


Figura 9 Vista lateral del cerebro de la lubina (*Dicentrarchus labrax*). Cerebelo (CE), lóbulo inferior del hipotálamo (IL), bulbos olfatorios (OB), Nervio óptico (OpN), tectum óptico (OT), hipófisis (P), Telencéfalo (TEL). (Modificado de Cerdá-Reverter *et al*, 2001a)

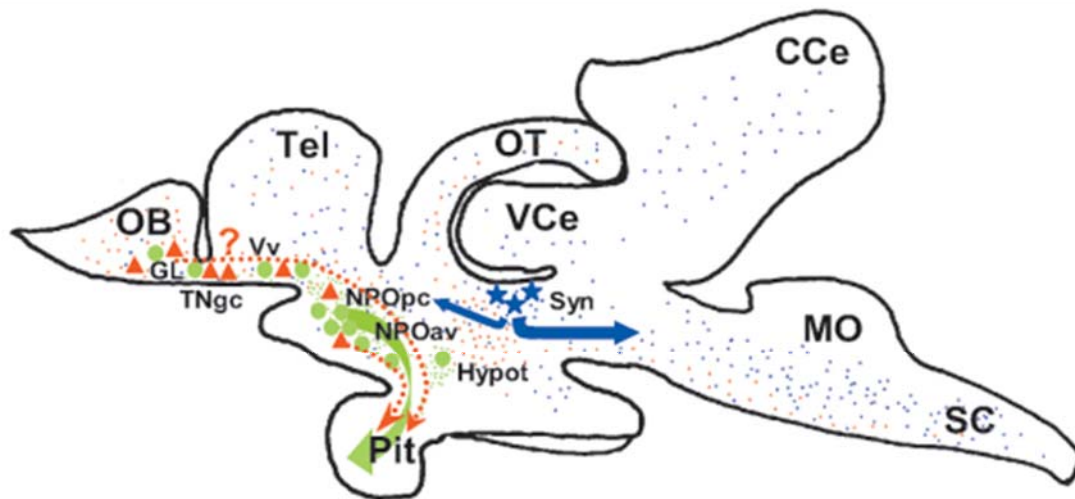


Figura 10. Esquema de encéfalo de lubina (*Dicentrarchus labrax*). Abreviaciones. Bulbo olfatorio (OB), Telencéfalo (Tel), tectum óptico (OT), corpus del cerebelo (CCe), valvula del cerebelo (VCe), Medula oblongata (MO), medula espinal (SC), Ganglio del nervio terminal (TNgc), parte ventral del telencéfalo (Vv), hipotálamo (Hypot), sinencéfalo (Syn), pituitaria (Pit) (hipófisi). (Modificado de González-Martínez et al, 2002a)

EL TELENCÉFALO

La región más anterior del cerebro de los peces, el telencéfalo o cerebro anterior, está vinculado principalmente a la recepción, elaboración y conducción de los impulsos olfativos. Su tamaño relativo varía de acuerdo con el grado en que el olfato juega un papel en la vida de la clase del pez examinado. El nervio olfatorio, o nervio craneal I, penetra al cerebro a partir del epitelio sensorial de las laminillas olfatorias o placoda que están ubicadas en el orificio o fosa nasal de los peces óseos (Osteichthyes), mientras que los nervios olfatorios derecho e izquierdo están acompañados por otro par de nervios, los nervios pequeños terminales, que se cree que tienen funciones vasomotoras más que sensoriales. Hacia adelante y a cada lado, el telencéfalo está compuesto de un bulbo olfatorio seguido en dirección caudal por un lóbulo olfatorio y de dos cavidades internas, que corresponden a los ventrículos I y II. Los peces óseos que dependen especialmente del olfato para su alimentación o de las relaciones sociales, tienen lóbulos olfatorios muy grandes. Estos lóbulos, en su lado ventrolateral, contienen un ganglio grande conocido como el cuerpo estriado, que es un centro de correlación, principalmente para retransmitir los impulsos olfatorios a los centros nerviosos sensoriales posteriores o somáticos. El manajo más anterior de fibras nerviosas que conecta los dos lados del cerebro, es la comisura anterior, está localizada en el

telencéfalo, y recorre a través de la llamada lámina terminal, la pared anterior media de todo el sistema del canal neural (Bernstein, 1970; Torrey, 1978).

Aunque la olfacción es una función obvia, no es la única que tiene el telencéfalo de los peces con espinas en las aletas (*Actinopterygii*), también se piensa que tiene una función adicional generalizada, facilitando las actividades de los centros y mecanismos del cerebro inferior. El desarrollo morfogenético del cerebro anterior de los teleósteos es enteramente diferente del de otros vertebrados, en el sentido de que se forma mediante la eversión de las paredes laterales del área dorsal (palial), en contraposición a la evaginación que da lugar a los ventrículos laterales. En consecuencia, el cerebro anterior de los actinopterigios retiene un ventrículo ventral (subpalio) único y medio, en contraste con los ventrículos ventrales (basales) pareados de los peces inferiores y otros vertebrados (Bernstein, 1970; Torrey, 1978).

El telencéfalo de los peces está extensamente innervado por fibras olfatorias secundarias del bulbo olfatorio. Estas fibras se proyectan a través de la porción subpalial de cada hemisferio y también se proyectan a las áreas basolaterales del palio. El resto del palio del telencéfalo de los actinopterigios parece que no recibe fibras olfatorias secundarias (Bernstein, 1970; Torrey, 1978; Cerdá-Reverter, 2001a).

EL DIENCÉFALO

Una constricción dorsoventral, y a menudo también una lateral pronunciada, marca la transición entre el telencéfalo y el diencéfalo de los peces. Hacia la porción dorsal, el parencéfalo o saco delgado dorsal, forma el techo de la cavidad dentro del diencéfalo, también conocido como tercer ventrículo. Hay dos sitios destacados a lo largo de la línea media del diencéfalo en las lampreas, los órganos parapineal y pineal, también conocidos como órganos epifisarios localizados ligeramente hacia la izquierda y hacia la derecha de la línea media, respectivamente. Sin embargo, en los tiburones adultos, como en el resto de los vertebrados y en los peces óseos actinopterigios, el órgano pineal es una estructura cuya función es la recepción de estímulos luminosos más o menos difusos. El resto del diencéfalo puede ser dividido en una región epitalámica con su ganglio habenular, un tálamo y un hipotálamo, como su más grande e importante componente. Los nervios ópticos penetran al cerebro y

cruzan hacia adelante hasta el diencefalo, y esta región del cerebro se une posteriormente a la porción ventral del mesencefalo a través del saco vascular de paredes delgadas y con circunvoluciones. Debajo del hipotálamo se adosa la hipófisis ó glándula pituitaria, que en los peces óseos es sostenida por un pedúnculo o infundíbulo. El tálamo sirve como un centro de relevo para la transmisión de los impulsos olfatorios y los del cuerpo estriado a los tractos tálamo-medular y tálamo-espinal. En su región ventral, hacia la base del cerebro y del hipotálamo, se apoya el núcleo geniculado o ganglio, que recibe algunas conexiones del nervio óptico (Bernstein, 1970; Torrey, 1978; Cerdá-Reverter, 2001a).

En el quiasma óptico de todos los peces las fibras nerviosas de la retina de un ojo cruzan el techo óptico para llegar al otro lado del mesencefalo pasando la intersección o cruce de las fibras de un ojo por sobre e inclusive a través del manojo de fibras del otro ojo (Bernstein, 1970; Cerdá-Reverter, 2001a).

Parece ser que el diencefalo de los peces es un importante centro de correlación para la llegada y la salida de mensajes relacionados con la homeostasis interna, y el hipotálamo afecta especialmente al sistema endocrino a través de la glándula pituitaria (Bernstein, 1970; Cerdá-Reverter, 2001b).

LA HIPÓFISIS

La hipófisis es una de las glándulas que participa en el control hormonal de la reproducción. Se localiza en la base del diencefalo, por detrás del quiasma óptico y delante del saco vasculoso. Con un doble origen, una parte deriva directamente del sistema nervioso y se llama neurohipófisis, mientras que la otra está formada por la evaginación ectodérmica del techo de la cavidad bucal embrionaria y es conocida como adenohipófisis. Esta última, secreta 6 diferentes hormonas (GH, ACTH, TSH, FSH, LH, PRL), y en peces se le reconocen 3 partes: una rostral o *pars distalis rostralis* (PDR), otra más caudal o *pars distalis proximalis* (PDP) que contiene a las células gonadotropas y somatotropas, y un *pars intermedia* (PI) (Figura 11). La actividad de las células productoras de gonadotropinas está regulada por neurohormonas de origen hipotalámico y esteroides sexuales, teniendo así una importante posición en el eje que sirve para asegurar la reproducción (Eckert *et al.*, 1990; Espinosa y Labarata, 1986; Peter *et al.*, 1990; Van Oordt y Peute, 1983; Anglade *et al.*, 1993). Como en mamíferos, la hipófisis de los peces juega un papel central regulador en el control del crecimiento, del desarrollo, la reproducción y la adaptación a los cambios ambientales como salinidad y la temperatura (Kasper *et al.*, 2006). Diferente a los mamíferos, los peces teleósteos carecen de un sistema porta-hipotálamo-hipofisiario para el transporte de las neurohormonas, por lo que existe un transporte axonal directo entre las neuronas hipitálamicas y las células endocrinas hipofisarias, vía el tallo hipofisario y la pars nerviosa (PN) (Weltzien *et al.*, 2004; Kasper *et al.*, 2006).

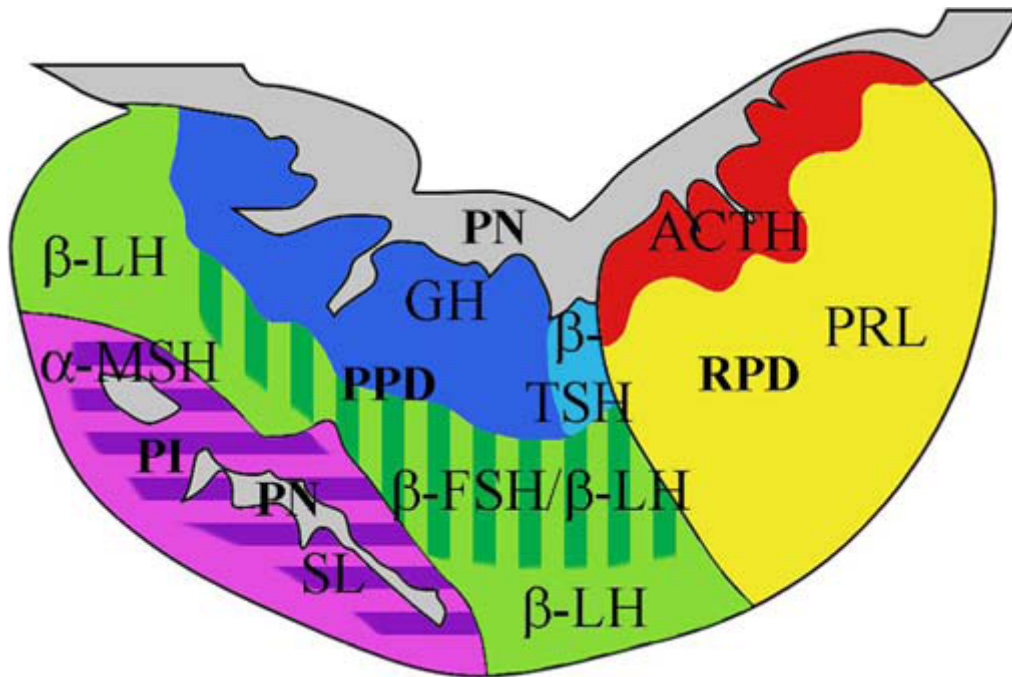


Figura 11. Mapa de localización de todas las hormonas de la hipófisis de un teleosteo. La pars distalis rostral (RPD), está en rojo (la región ACTH) en amarillo,(la región PRL) . La pars distalis proximal (PPD) azul oscuro (GH) en azul claro (TSH-β) y en verde ambas (LH-β y FSH-β). La pars intermedia (PI) violeta (MSH-α). La pars nervosa (PN) gris. (Modificado de Kasper *et al*, 2006).

Las células productoras de hormonas de la adenohipófisis se han investigado por algunas décadas por medio de métodos de tinción, inmunohistoquímica y biología molecular (Agulleiro *et al*, 2006). Con estos métodos, las células adenohipofisiarias que secretan hormonas, se han caracterizado y localizado en diversas especies de teleosteos donde los tipos celulares productores de hormonas están arreglados en mosaico en la hipófisis de tetrápodos adultos. La hipófisis de teleosteos preserva la organización compartamental embrionaria, ya que cada tipo celular produce una hormona específica localizada en un compartimento particular. Estos compartimientos representan un modelo para el estudio de la ontogenia y filogenia de la hipófisis (Weltzien *et al*, 2004).

EL MESENCÉFALO

El mesencéfalo o cerebro medio de los peces es relativamente grande; consta del *tectum* óptico dorsal que aparece en la vista dorsal, como los dos lóbulos ópticos y tegmento ventral. El *tectum* está formado de un cierto número de células nerviosas de diferentes tamaños, la mayoría de las fibras del nervio óptico terminan en el *tectum*, de tal manera que la porción frontal de la retina se proyecta en la porción caudal contralateral del *tectum*, en forma contralateral, en los peces. Los peces al igual que los demás vertebrados, tienen en sus ojos lentes convexos que forman una imagen invertida en la retina; que a través de la configuración tectal, proyecta la imagen tal como es en la naturaleza. Entre los peces óseos actinopterigios la materia gris tectal se extiende hacia el ventrículo como un *torus longitudinalis* pareado y se une a la comisura posterior entre los dos hemisferios que descansan en el borde del diencefalo , y esta presumiblemente relacionado con la visión (Bernstein, 1970; Torrey, 1978; Sarnat *et al*, 1976).

EL METENCÉFALO

El cerebelo se desarrolla en el metencéfalo a partir de un aumento de volumen de la médula subyacente, como un crecimiento externo dorsal del borde posterior del 4to. Ventrículo del cerebro. Se sabe que sus principales funciones se relacionan con el equilibrio durante la natación, el mantenimiento del tono muscular y la orientación en el espacio; además es el mayor componente del cerebro de algunos peces. En el cerebelo pueden distinguirse muchas capas diferentes formadas por células nerviosas de diferentes formas, que incluyen a la capa celular receptora o molecular y a las células llamadas de Purkinje, que son de gran importancia en el cerebelo de los vertebrados superiores (Bernstein, 1970; Torrey, 1978)

El cerebelo adquiere en los peces óseos actinopterigios una característica proyección hacia adelante, la válvula cerebelosa que se extiende por debajo del techo óptico. El ventrículo del cerebelo ha desaparecido casi por completo en los peces óseos, como ha sucedido también con los pliegues transversales. Las aurículas laterales y las fibras interauriculares aumentan en importancia especialmente en los peces que tienen órganos de la línea lateral bien

desarrollados. Participa en el equilibrio, en la natación, así como en la puesta o el comportamiento parental (Bernstein, 1970; Torrey, 1978; Sarnat *et al*, 1976).

EL MIELENCÉFALO

Las divisiones cerebrales desde el cerebelo al telencéfalo son, en su más amplio sentido, centros sensoriales y centros coordinadores de las sensaciones que se conectan con el tallo cerebral ó mielencéfalo, mediante varios tractos neurales. Estas cuatro divisiones situadas en la porción más anterior han aumentado en importancia como integradores sensoriales y se han vuelto más y más perfeccionados en el curso de la evolución. El mielencéfalo, con la médula oblongada como su componente más importante, es el centro a donde llegan los nervios sensoriales, con excepción de los del olfato y la visión. La distinción entre la médula oblongada y la médula espinal de los peces es imprecisa. La médula puede estar dividida en columnas de fibras nerviosas basadas en el tipo de información transmitida; por lo tanto, hay columnas sensoriales somáticas y viscerales, así como columnas motoras somáticas y viscerales (Bernstein, 1970; Torrey, 1978; Sarnat *et al*, 1976).

En el tallo cerebral, los núcleos de los nervios craneales III a X están dispuestos anteroposteriormente, mientras que los tractos de los nervios III y IV cruzan hacia el lado contralateral. Los componentes de los nervios aferentes del tallo cerebral pueden estar divididos en nervios sensoriales somáticos y especiales que entran con los nervios craneales VII (facial), VIII (estato-acústico), IX (glossofaríngeo) y X (vago), la mayoría de ellos sensoriales (Bernstein, 1970; Torrey, 1978; Sarnat *et al*, 1976).

La médula de los peces óseos actinoptergios contiene un par de neuronas grandes al nivel del nervio craneal VIII, conocidas como las células gigantes de Mauthner. Las dendritas laterales de estas células de Mauthner se conectan con las fibras de los nervios craneales V, VII, IX, y X, al cerebelo y al tecto óptico, ya que sus axones pasan a través de la médula espinal hacia los músculos de la cola y están mejor desarrollados en los peces que son buenos nadadores, como el salmón del Atlántico y ciertas truchas (Bernstein, 1970; Torrey, 1978; Sarnat *et al*, 1976).

Además de ser un área de relevo entre la médula espinal y el cerebro, la médula tiene también centros que controlan ciertas funciones somáticas y

viscerales. Estas incluyen, en los peces óseos, los centros respiratorios y los osmorreguladores. Los núcleos medulares también están relacionados con el mantenimiento del equilibrio durante la natación (Bernstein, 1970; Torrey, 1978; Sarnat *et al*, 1976).

6.- CONSIDERACIONES DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

El género *Chirostoma* pertenece a la familia *Atherinopsidae* (Figura 12) que se distribuye en el altiplano y la vertiente centrooccidental del país, e incluye a los peces blancos mexicanos y a los charales. Algunas de sus especies como el pez blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*) o el pez blanco de Chapala (*Chirostoma chapalichthys*) y el charal grande o pez blanco del altiplano (*Ch. humboldtianum*) han sido ampliamente utilizadas para la alimentación humana desde tiempos prehispánicos (Rojas y Sasso, 2005).

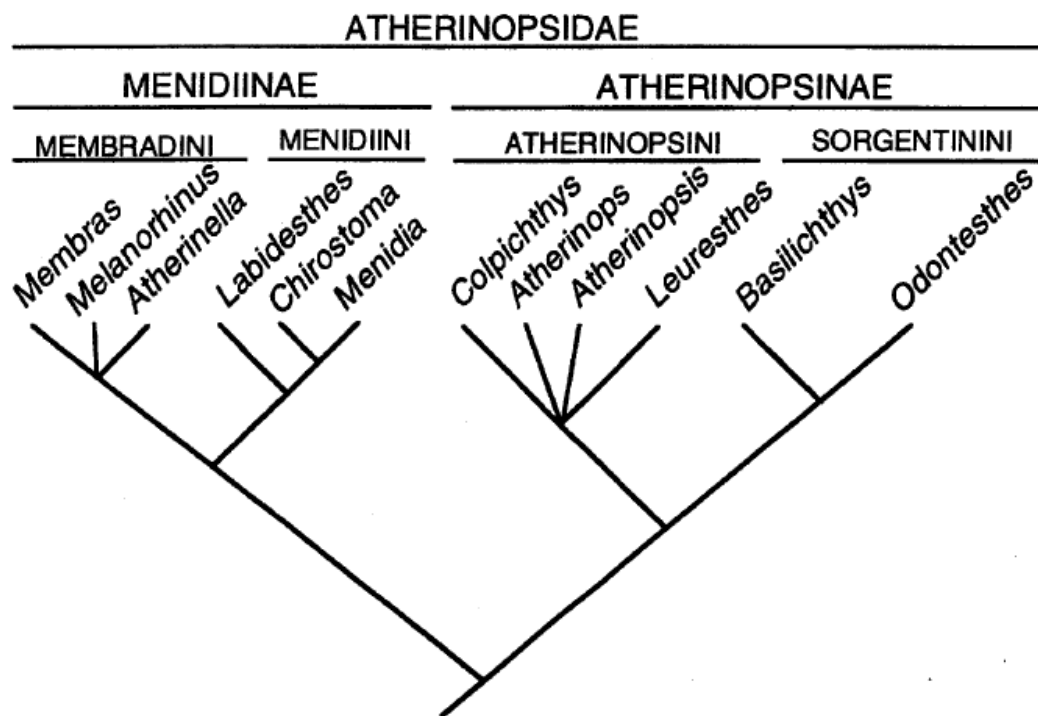


Figura 12. Relaciones filogenéticas entre géneros de la familia *Atherinopsidae* (Dyer y Chernoff, 1996).

El *Chirostoma humboldtianum* como otros pescados blancos tienen un gran valor comercial y su cultivo ofrece excelentes posibilidades económicas (Méndez-Sánchez *et al*, 2002). Su importancia también se ubica en el ámbito ecológico dado que son especies nativas y endémicas de ambientes lacustres de la Mesa Central de México, de manera que no existen en ningún otro lugar del mundo. Por otro lado, constituye la contraparte de los pejerreyes argentinos; que aún cuando comparten la misma familia tiene un género distinto, y junto con varias especies alcanzan tallas mayores a los 20 cm, y como talla máxima 42 cm de longitud total. (Figura 13) (Dyer y Chernoff, 1996). Los pescadores lo diferencian de los *chacuami* y *charari*, o charales, que son

otras especies de la misma familia Atherinopsidae, porque estos últimos tienen una talla menor. (Rojas y Sasso, 2005).



Figura 13. *Chirostoma humboldtianum* de la laguna de Zacapu, Michoacán.

En el lago de Pátzcuaro, las especies de pescado blanco y la cultura purépecha constituyen un binomio cuyo origen se remonta a la llegada de los primeros pobladores a esta región. Por tratarse de especies nativas, sus pesquerías se han desarrollado formando parte consustancial de lo purépecha. Tanto en este lago como en Chapala y Zirahuén, el pescado blanco constituye la pesquería más importante en términos de valor comercial, con una gran demanda regional. En México son pocos los estudios sobre la biología de la reproducción y el crecimiento, realizados con especies endémicas de peces. Los trabajos sobre el género *Chirostoma* han sido sobre taxonomía, distribución, desarrollo embrionario, hábitos alimenticios y pesquería (Paulo-Maya *et al.*, 2000).

LAS ESPECIES Y SU DISTRIBUCIÓN NATURAL

La Mesa Central fue asiento de un proceso evolutivo relativamente reciente que devino en la existencia de 19 especies y seis subespecies nativas que conforman la fauna ictiológica dulceacuícola de la familia *Atherinopsidae* en México, agrupados en el género *Chirostoma*. La distribución natural del género abarca los estados de Michoacán, Jalisco, Nayarit, Aguascalientes, Estado de México y Guanajuato (Barbour, 1973). De éstas, cuatro especies y dos subespecies corresponden al pescado blanco, y se desarrollaron en los lagos de Pátzcuaro y Zirahuén en Michoacán y en el lago de Chapala en Jalisco y Michoacán. El lago de Pátzcuaro es la localidad de tres especies de charal (*C. grandocule*, *C. attenuatum* y *C. patzcuaro*) y una subespecie de pescado blanco (*Chirostoma estor estor*). Por su parte, el lago de Zirahuén lo es para una subespecie de charal (*C. attenuatum zirahuén*) y una de pescado blanco (*Chirostoma estor copandaro*). Mientras que en el lago de Chapala se encuentra el mayor número de especies de este género, con seis de charales (*C. jordani*, *C. chapalae*, *C. labarcae*, *C. arge*, *C. consocium* y *C. contrerasi*) y tres de pescado blanco (*Chirostoma lucius*, *Chirostoma sphyraena* y *Chirostoma promelas*). Por su parte, la cuarta especie de pescado blanco *Chirostoma humboldtianum* es quizá la de más amplia distribución natural, ya que tiene como lugares de origen la laguna de Zacapu, el río Lerma, los lagos del Valle de México, de Santa María, de San Pedro Lagunillas en Nayarit y el lago Juanacatlán en Jalisco (Paulo-Maya *et al.*, (2000).

En los años setenta se realizaron translocaciones de especies de pescado blanco y de charales en cuerpos de agua de los estados de Chihuahua, Puebla, Tamaulipas, Hidalgo, Querétaro, Guanajuato y Estado de México y Michoacán, por lo que se ha ampliado su distribución artificialmente (Rojas y Sasso, 2005).

C. JUSTIFICACIÓN

Al ser la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) una molécula estimuladora de la secreción de las gonadotropinas, y que presenta diferentes isoformas, no todas involucradas en el proceso reproductivo, es importante establecer la distribución de la variante presente en el cerebro anterior y en la hipófisis en *Chirostoma humboldtianum*, para de esta manera comenzar a conocer las relaciones anatomofuncionales que regulan procesos tan importantes como la reproducción en esta especie de pez endémico mexicano, que es sumamente utilizado para la alimentación humana. Además la acuicultura tiene como objetivos básicos la reproducción de las especies de mayor interés socio-económico, así como la supervivencia y la mejora de la calidad de la progenie. En la práctica, esta actividad supone el mantenimiento de los peces en condiciones de cautiverio, con el objeto de comercializarlos para su consumo o con la intención de incrementar su producción por encima de los niveles obtenidos en el medio natural. El cultivo intensivo de peces ocasiona, 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 de cautiverio, probablemente por la falta de síntesis y/o liberación de gonadotropinas en este periodo y otras no lo llegan a hacer nunca (Matsumaya *et al*, 1991). Es por ello que el conocimiento de los mecanismos que regulan la función reproductora de esta especie de interés económico es un requisito indispensable para el desarrollo de la acuicultura, ya que una vez adquiridos los conocimientos necesarios sobre el proceso reproductor y su regulación en una especie determinada es posible controlar en cierta medida las distintas etapas de la reproducción.

En otro orden de ideas, el uso de recursos endémicos como *Ch. humboldtianum* con fines comerciales, lleva implícita la obligación de conocer lo más detalladamente posible sus características biológicas, y con ello contribuir a plantear mejores alternativas para su manejo y cultivo, ayudando de esta manera a implementar explotaciones comerciales donde se puedan hacer manejos reproductivos.

Por ello, en el presente estudio se propone conocer la distribución de sGnRH en el cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*, con lo cual se pretende sentar las bases para posteriores estudios de la fisiología reproductiva de dicha especie, coadyuvando a establecer cimientos más sólidos para la realización de cultivos comerciales de este grupo de peces de importancia económica en México.

III. OBJETIVOS

1.-OBJETIVO GENERAL

Establecer la distribución de la hormona liberadora de gonadotropinas, isoforma de salmón (sGnRH) en el cerebro anterior y la hipófisis de *Chirostoma humboldtianum*.

2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Establecer la distribución de sGnRH en el cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*
- b) Determinar si la isoforma sGnRH esta presente en la hipófisis de *Chirostoma humboldtianum*.

IV. HIPÓTESIS

La distribución de la hormona liberadora de gonadotropinas de salmón (sGnRH) de *Chirostoma humboldtianum* se localizará en el cerebro anterior e hipófisis.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron 14 ejemplares de *Chirostoma humboldtianum* (11 hembras y 3 machos maduros). En un intervalo de longitud patrón de 11.5 –16 cm, de peso de 13 – 23 g. de la laguna de Zacapu, en el Estado de Michoacán. En la Fig. 14 se ilustra la metodología seguida para este estudio.

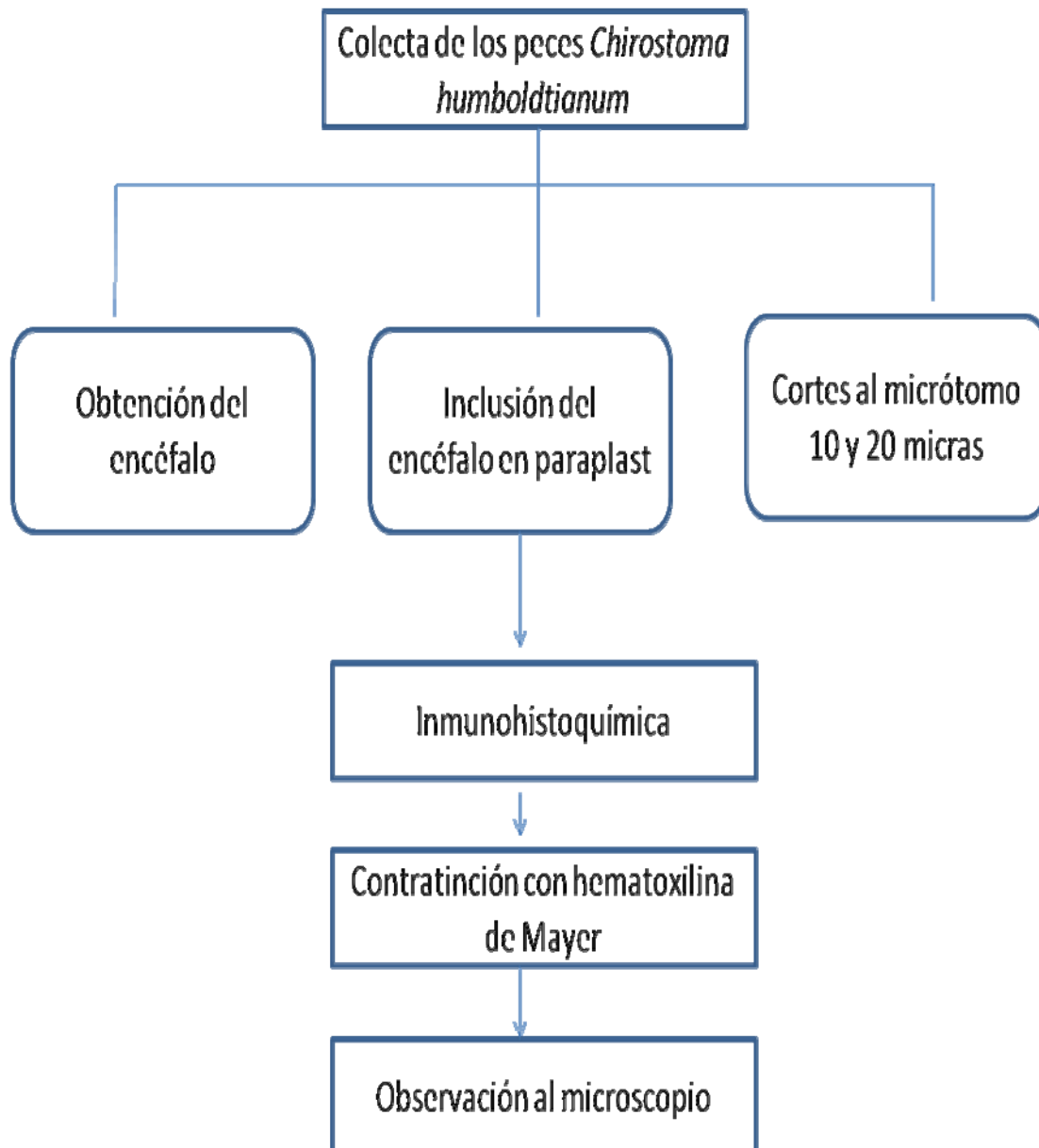


Figura 14. Ilustra la metodología empleada para la observación de la distribución de sGnRH de *Chirostoma humboldtianum*.

1.-Colección del tejido

Los peces se anestesiaron con MS-222 Sigma ® se sacrificaron por decapitación

y se extrajo el encéfalo y la hipófisis, mismos que se colocaron en una solución amortiguadora de formaldehído con picrato (Stefanini *et al*, 1967) (ver apéndice 1) durante 24 horas.

2.-Procesamiento del tejido

Ambos tejidos se lavarón con amortiguador de fosfatos (PBS 0.1 M, pH 7.4) posteriormente, se incluyeron los tejidos en parafina con la técnica de Martoja (1970) de la siguiente manera:

Se deshidrataron los tejidos mediante concentraciones crecientes de alcohol (70%, 80%, 90%, 96% y 100%), dejando la muestra 30 minutos en cada concentración, excepto en la última, en la cual se dejó 45 minutos. Deshidratado el tejido, se colocó en alcohol amílico durante 24 horas posteriormente se pasó por 2 cambios de parafina durante 2 horas cada una. Finalmente, se incluyó el tejido en Paraplast y se realizaron cortes transversales y sagitales seriados con grosor de 10 y 20 micras en un microtomo rotatorio.

Antes de realizar la técnica inmunohistoquímica los cortes se desparafinaron durante 30 minutos a 60° C, posteriormente colocados en xileno e hidratado el tejido mediante concentraciones descendientes de alcohol (100%, 96%, 90%, 80% y 70%).

3.-INMUNOHISTOQUIMICA

La técnica inmunohistoquímica se llevo a cabo según el método descrito por Taylor y Burns, (1974), y utilizando un anticuerpo específico contra el sGAP recombinante elaborado en conejo donado por el Dr. Gustavo M. Somoza y validado por Guilgur, 2008, del laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura. Instituto Tecnológico de Chascomús-Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional de General San Martín, Chascomús, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

La muestra se permeabilizo con metanol a -20°C , durante 5 minutos. Posteriormente, se lavó con PBS (0.1 M, pH 7.4) y se procedió a inactivar la peroxidasa endógena con etanol ácido. Los cortes se lavaron tres veces con el mismo amortiguador e inmediatamente después, se bloquearon los sitios inespecíficos con suero bovino al 1% con PBS (0.1 M, pH 7.4) a temperatura ambiente, durante media hora. Una vez bloqueados los sitios inespecíficos se incubó con un anticuerpo de conejo anti-sGAP en una dilución 1/1000 a 4°C durante toda la noche. Cumplido el tiempo se lavó con PBS (0.1 M, pH 7.4) y se procedió a incubar con un anticuerpo de chivo anti-IgG de conejo H+L peroxidado en una dilución 1/200 por 2 horas a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se lavó con PBS (0.1 M, pH 7.4) y se procedió a revelar, utilizando una solución sustrato con 20 mg de diaminobecidina (DAB), (0.16% de H_2O_2 en 100 ml de PBS 0.1 M, pH 7.4). Cuando la reacción fue visible (de 1 a 15min) se procedió a lavar nuevamente con PBS (0.1 M, pH 7.4). Después, se contratiñó con hematoxilina de Mayer y se deshidrató mediante concentraciones crecientes de alcohol (70%, 80%, 90%, 96% y 100%), para su aclaramiento con xileno y montaje con resina sintética Entellan ® Merck. Las laminillas se revisaron en un microscopio Nikon y las área y núcleos inmunoreactivos en el encéfalo, se identificaron de acuerdo a la metodología descrita por Amano *et al* (1991) y Peter y Gill (1975).

4.-CONTROLES.

Para validar el ensayo dentro de nuestro laboratorio, se realizaron cuatro ensayos, observando que la inmunoreacción fuera específica para sGnRH. El primero se realizó sin inactivar la peroxidasa endógena agregando el sustrato (DAB) el cual no tuvo reacción. El segundo ensayo se hizo inactivando la peroxidasa endógena, agregando el sustrato sin los anticuerpos en la que no se observó reacción. El tercer ensayo se realizó sin bloquear los sitios inespecíficos, sin el primer anticuerpo (anti-sGAP) y con el segundo anticuerpo (anti-IgG de chivo anticonejo H+L peroxidado) diluido en PBS (0.1 M, pH 7.4), en el cual tampoco se observó reacción. El último ensayo, se llevó a cabo poniendo el segundo anticuerpo (anti IgG de chivo anticonejo H+L peroxidado) sin el primer anticuerpo (anti sGAP), el cual también no presentó reacción.

VI. RESULTADOS

La isoforma fue encontrada en el cerebro anterior, específicamente, en el núcleo preóptico periventricular, el núcleo preóptico magnocelular (Figura 15 y 16) y se encontraron fibras inmunoreactivas en el hipotálamo y área preóptica ventral.

También se mostró inmunoreacción en la hipófisis (Figura 17). Por otro lado, no se detectaron diferencias entre machos y hembras.

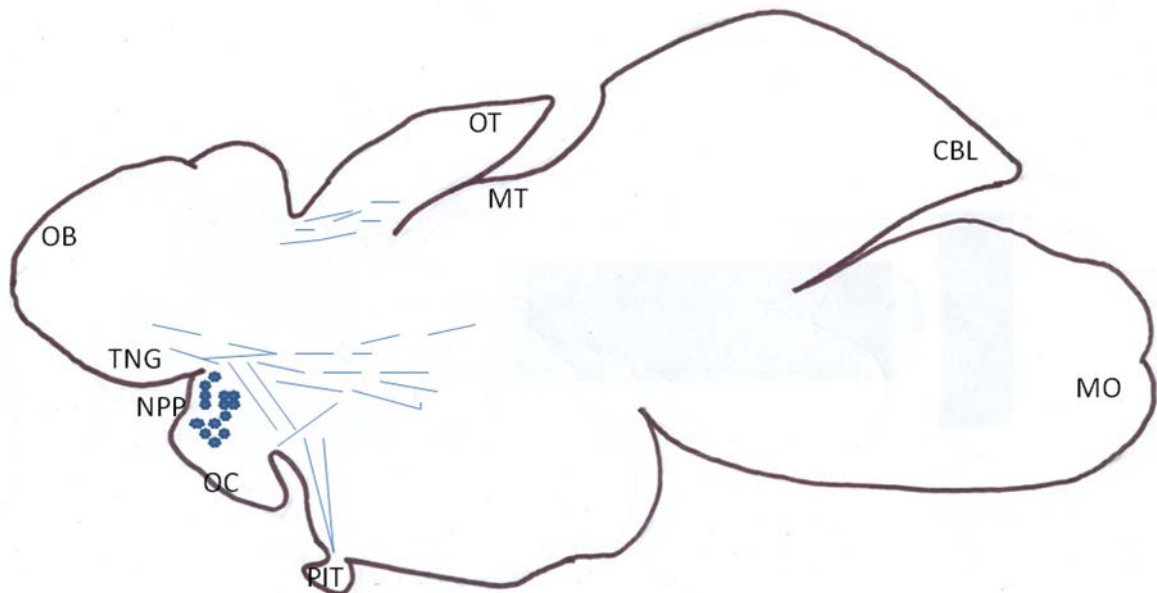


Figura 15. Esquema de un corte mediosagital de cerebro de *Chirostoma humboldtianum*, donde se aprecia la distribución de sGnRH. Los puntos azules indican el sitio donde se encontró inmunorreacción a sGnRH. Muestran la distribución en el núcleo preóptico periventricular (NPP). Abreviaciones: *medulla oblongata* (MO); *cerebellum* (CBL); *optic tectum* (OT); *tegmentum* cerebro medio (MT); hipófisis (PIT); quiasma óptico (OC); *nucleus preopticus periventricularis*. (NPP), bulbo olfatorio (OB), Ganglio del nervio terminal (TNG).

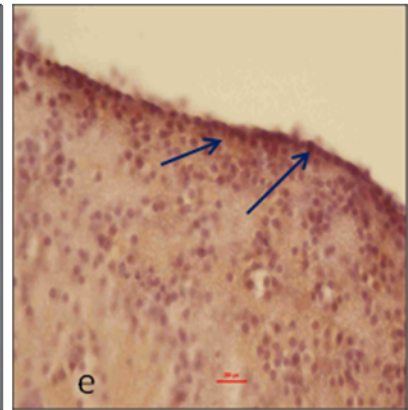
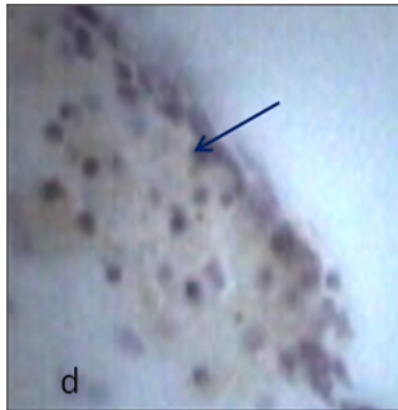
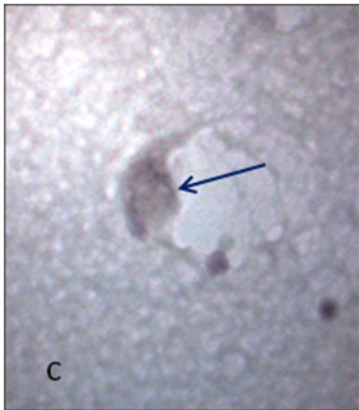
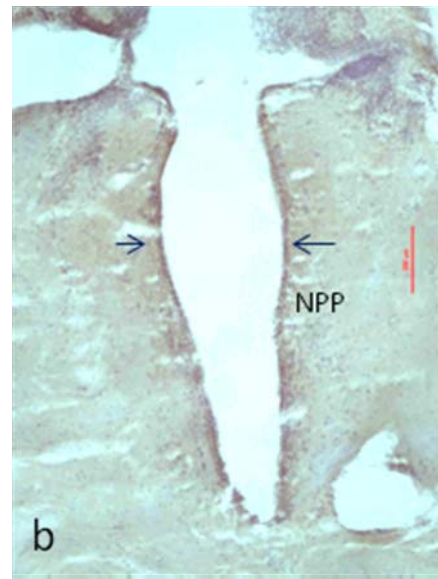
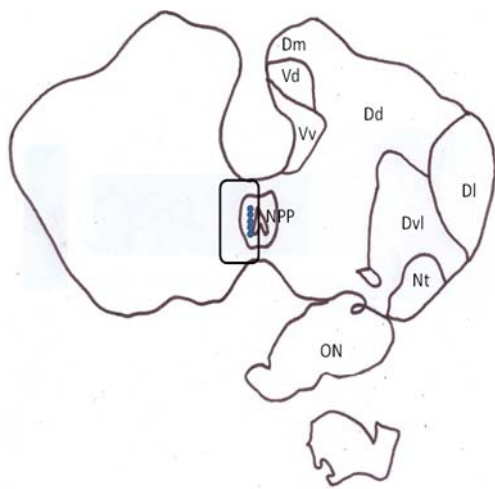


Figura 16. a) Esquema de corte frontal de la zona del cerebro anterior de *Ch. humboldtianum*. Abreviaciones; núcleo preóptico periventricular (NPP), núcleo tenia (Nt), regiones dorsales (Dx) y ventrales (Vx) del telencéfalo, nervio óptico (ON). Los puntos azules indican el sitio donde se encontró inmunorreacción a sGnRH. b) Núcleo preóptico periventricular, (flechas) microscopía de campo claro, contratinción hematoxilina de Mayer, (10X), c) Neurona inmunoreactiva del núcleo preóptico periventricular (flecha), microscopía de campo claro, contratinción hematoxilina de Mayer (100X), d y e) Neuronas inmunoreactivas del núcleo preóptico magnocelular (flechas) microscopía de campo claro, contratinción hematoxilina de Mayer (100X). En todos los casos la inmunorreacción positiva a sGnRH se indica con las flechas.

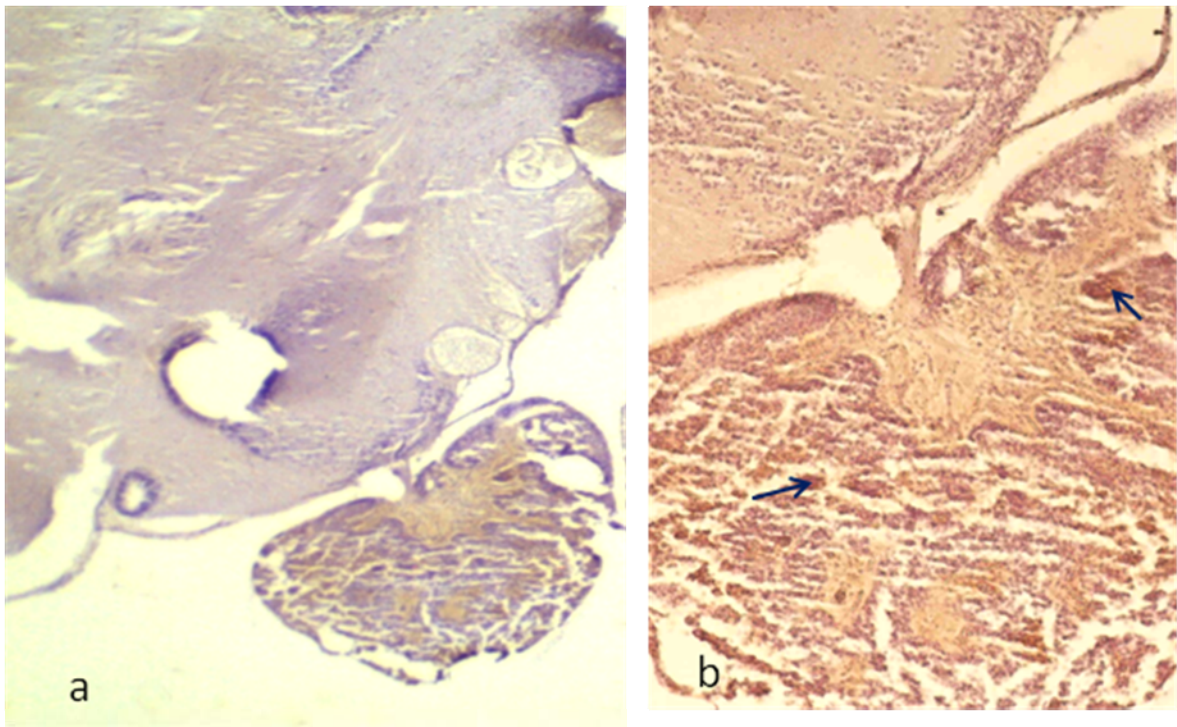


Figura 17. Corte mediosagital de cerebro de *Chirostoma humboldtianum* a) Se aprecia la conexión del cerebro con la hipófisis, microscopia de campo claro, contratinción hematoxilina de Mayer (10X), b) se aprecia inmunoreacción en la adenohipófisis (flechas) microscopia de campo claro, contratinción hematoxilina de Mayer (20X).

VII. DISCUSIÓN

Este trabajo reporta por primera vez la distribución de la isoforma sGnRH en *Chirostoma humboldtianum* en una zona del encéfalo, el cerebro anterior.

La importancia de la localización de las neuronas sGnRH en el cerebro de *Chirostoma humboldtianum* radica principalmente en tratar de comprender su posible participación en la reproducción, basados en la comparación con otras especies de teleósteos, de dicha distribución neuronal sGnRHnrgica en las mismas regiones del encéfalo de esta especie.

En el cerebro de peces óseos, solo las neuronas preópticas liberan GnRH a la hipófisis en cantidades substanciales (González- Martínez *et al*, 2002b). La distribución de la isoforma sGnRH encontrada en *Chirostoma humboldtianum* en el núcleo preóptico periventricular y el núcleo magnocelular nos permite sugerir que esta isoforma puede ser la liberada a la hipófisis dado que, se ha observado que sGnRH es capaz de estimular la liberación de gonadotropinas *in vitro*, en pez dorado (Mackenzie *et al*, 1984) en trucha (Weil *et al*, 1986) en carpa común (Lin *et al*, 1994), como *in vivo* en pez dorado (Peter *et al*, 1985) y por tanto tener la función hipofisiotrópica.

En la actualidad, un punto de discusión interesante se refiere a que, no todos los peces teleósteos presentan los tres tipos de GnRH bien delimitado (González- Martínez *et al*, 2002a; Mohamed *et al*, 2005; Vickers *et al*, 2004) se ha observado traslapada la distribución de neuronas que producen GnRH1 y GnRH3 en el cerebro anterior (González- Martínez *et al*, 2002a; Mohamed *et al*, 2005, Vickers *et al*, 2004; Mohamed y Khan, 2006). Estas evidencias pueden explicar la distribución encontrada para sGnRH en el cerebro de *Chirostoma humboldtianum* ya que, además de encontrarla en el cerebro anterior específicamente en el núcleo preóptico periventricular, también se localizó inmunoreacción en la hipófisis como lo reportó Prassada-Rao (1999), todas las neuronas en el núcleo preóptico inervan a la hipófisis, por lo tanto, ello nos permite sugerir que sGnRH es la isoforma presente en la hipófisis en este pez endémico. La sobreposición de sGnRH en *Chirostoma* puede también

apoyarse en el hecho de la distribución de las isoformas de GnRH encontrada en el cerebro del pejerrey *Odontesthes bonariensis* una especie emparentada con *Chirostoma* (ambos pertenecen a la misma familia Atherinopsidae), en donde mediante un estudio inmunohistoquímico utilizando diferentes anticuerpos para las diferentes variantes de GnRH, sGnRH, pjGnRH y cGnRH-II, revelaron tres diferentes áreas inmunoreactivas: el ganglio del nervio terminal (como en la unión entre el bulbo olfatorio y el telencéfalo anterior), el área preóptica anterior al hipotálamo y el tegmento del cerebro medio. También fueron detectadas fibras inmunoreactivas a GnRH en diferentes áreas del cerebro como: el bulbo olfatorio, el telencéfalo ventral, el hipotálamo, el área mesencéfala y una importante inervación que entra a la glándula hipófisis. En dicho reporte se incluye también la presencia de algunas neuronas multipolares del núcleo preóptico periventricular inmunoreactivas a la isoforma sGnRH, observándose que un importante grupo de fibras inmunoreactivas a dicha hormona se dirigen a la adenohipófisis del pez, además reportan la variante de GnRH específica de la especie (pjGnRH), localizándola en el cerebro anterior con un importante grupo de axones que corren en situación ventral hacia la parte posterior y que pudieran alcanzar la hipófisis (Stefano *et al.*, 2000).

Además, se han realizado diversos trabajos para demostrar la sobreposición de las isoformas 1 y 3 en cerebro anterior básicamente estos han sido desarrollados en algunas especies de teleósteos y con diferentes metodologías por ejemplo:

En la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), se demostró que cada uno de los tres mensajeros de GnRH son expresados en una región específica del cerebro y se describió por primera vez la sobreposición de las células que expresan sGAP y sbGAP en el telencéfalo y el diencéfalo de este pez, sugiriendo lo anterior, que los sistemas de GnRH1 y GnRH 3 no se segregan claramente, por lo menos en esta especie. Por ello, para evitar el problema de la reactividad cruzada cuando se utilizan anticuerpos relacionados con los deca péptidos a GnRH, se utilizaron anticuerpos generados para los diferentes GAPs, aprovechando que esta parte de cada una de las isoformas es más variable, y esto facilita la obtención de anticuerpos más particulares a cada una de las

isoformas de GnRH presentes en el encéfalo porque está reportado que la distribución de la inmunoreactividad a GnRH es similar a la del GAP (González-Martínez *et al*, 2001).

La sobreposición anatómica de isoformas de GnRH en el cerebro anterior es también reportada en el pez *Coregonus clupeaformis* y parece apoyar que esta condición puede ser más común de lo que originalmente se supuso. En esta especie, por medio de inmunocitoquímica, utilizando dos anticuerpos antiGnRH, uno que reconocía wfGnRH y sGnRH, y otro que identificaba sGnRH y cGnRH-II, encontraron células inmunoreactivas con localización sobrepuesta en el cerebro anterior. Debido a esta restricción técnica, utilizaron hibridación *in situ* con tres ribosondas diseñadas para cada una de las tres isoformas de GnRH, encontrando a la sGnRH en las neuronas del bulbo olfatorio, telencéfalo ventral y área preóptica; a la cGnRH-II en el cerebro medio, y a wfGnRH con una distribución en el telencéfalo ventral, área preóptica y el hipotálamo. En el cerebro anterior las células contenían sGnRH y wfGnRH en las mismas regiones del cerebro, pero, no colocalizadas en la misma célula. Debido a ello, los autores sugieren que ambas isoformas, sGnRH y wfGnRH tienen el papel de liberadora de gonadotropinas en el cerebro del pez blanco (Vickers *et al*, 2004).

Una posible explicación a la sobreposición de las isoformas en cerebro anterior es que, la presencia de los sistemas GnRH-1 y GnRH-3 se originó por duplicación de una de las isoformas y evolucionaron como sistemas independientes. (Palevitch *et al*, 2007). Esto, parece ser apoyado por el hecho de que ambos grupos de neuronas, GnRH 1 y GnRH3 surgen de la placoda olfativa y de acuerdo a la posición particular de las neuronas, migrarán para integrar el sistema GnRH-1 o GnRH-3 (Yoshida *et al*, 1995; Amano *et al*, 2002 a, b; González –Martínez *et al*, 2002b; Okubo *et al*, 2006; Palevitch *et al*, 2007). Sin embargo, hay un debate concerniente al origen de las neuronas sbGnRH o sistema GnRH 1, ya que estudios en la lubina europea y la lubina dorada demostraron que las neuronas sbGnRH son primeramente detectadas en el bulbo olfatorio y el telencéfalo ventral y más tarde migrarán a su posición

final en el área preóptica e hipotálamo (González - Martínez *et al*, 2002b; Wong *et al*, 2004)

Adicionalmente, se sugiere que algunos teleósteos han perdido el gene GnRH1 y sólo tienen GnRH2 y GnRH3. Dado que es la primera vez que se describe la presencia y distribución de una isoforma de GnRH para *Chirostoma humboldtianum*, no podemos descartar si esta condición de tan solo dos isoformas, se cumple para dicha especie, como sucede en algunos salmónidos y en ciprínidos. Como ejemplo de especies de teleósteos con solo dos GnRHs podemos citar lo reportado para el pez dorado (*Carassius auratus*), en el cual, la distribución de cGnRH-II y sGnRH en el cerebro, fue observada utilizando anticuerpos para cGnRH-II y sGnRH encontrando neuronas inmunorreactivas a cGnRH-II en cerebro medio e inmunorreactivas a sGnRH localizadas en el área entre el nervio olfatorio y el bulbo olfatorio (el ganglio del nervio terminal), el telencéfalo ventral, el área preóptica y el hipotálamo, encontrando también fibras inmunorreactivas a sGnRH distribuidas en varias regiones del cerebro desde el bulbo olfatorio hasta la médula espinal fue especialmente en los bulbos olfatorios, telencéfalo ventral, área preóptica, hipotálamo, techo óptico y el tálamo e inervando la *pars distalis proximalis* de la hipófisis, esto sugiere que sGnRH no solamente regula la liberación de las gonadotropinas, también actúa como neuromodulador en varias regiones del cerebro (Kim *et al*, 1995).

De forma similar, en otras especies como el salmón *Oncorhynchus masou*, se demostró la distribución de GnRH en el cerebro de este pez, por medio de un estudio inmunohistoquímico con dos anticuerpos, se encontró a la isoforma cGnRH-II en cerebro medio y sGnRH en áreas, entre el nervio olfatorio y el bulbo olfatorio, el bulbo olfatorio ventral, entre el bulbo olfatorio y el telencéfalo, el telencéfalo ventral y el área preoptica. También se encontraron fibras distribuidas en varias regiones del cerebro, desde el bulbo olfatorio hasta la médula espinal, especialmente abundantes en el bulbo olfatorio, el telencéfalo ventral, el área preóptica, el hipotálamo, el techo óptico y el tálamo y directamente inervando a la hipófisis. Estos datos sugieren que en el salmón masu, sGnRH no solamente actúa regulando la liberación de gonadotropinas

de la hipófisis, sino que también tiene funciones como neuromodulador en el cerebro (Amano *et al*, 1991).

Esto ha sido demostrado también en el pez cebrá *Danio rerio* (Steven *et al*, 2003; Palevith *et al*, 2007). En estas especies las neuronas GnRH 3 localizadas en el hipotálamo ventral parecen reemplazar a GnRH1 y proveer inervación a la hipófisis para regular la reproducción (Amano *et al*, 1995a, 2007; Yamada *et al*, 2002). En la tilapia *Oreochromis niloticus* GnRH3 parece estar implicada en el control del comportamiento reproductivo, en el anidamiento y en el comportamiento agresivo (Ogawa *et al*, 2006).

Se ha propuesto también que, GnRH 3 en el ganglio del nervio terminal puede funcionar en el sistema olfatorio y visual para lo cual es transportada para coordinar impulsos sensoriales con requerimientos reproductivos gracias a que las neuronas GnRH del nervio terminal de los teleósteos se proyectan a los nervios olfatorios y óptico (White *et al*, 1995). Además, la GnRH3 del nervio terminal es capaz de influenciar el procesamiento de la señal en la retina en el pez dorado y en el cíclido (White *et al*, 1995; Behrens *et al*, 1993, Grens *et al*, 2005).

Así, la organización de los sistemas GnRH se ha determinado principalmente mediante técnicas inmunohistoquímicas, pero debido a la alta homología existente entre los distintos decapeptidos (60-90%), dichos estudios cuentan con algunas limitaciones (Kah *et al*, 1986., Amano *et al*, 1991), Por lo tanto, actualmente, se prefiere la utilización de anticuerpos y ribosondas dirigidos hacia el GAP (Ronchi *et al*, 1992, González -Martínez *et al*, 2001, 2002a).

Esta isoforma se localizó en el cerebro anterior que posee una marcada influencia sobre la hipófisis, por lo qué, es razonable atribuirle un papel como neurohormona hipofisiotrópica, en especial, en la regulación de la reproducción. Esto, tiene una gran importancia para la comprensión de la endocrinología de la reproducción de esta especie, pues al presentarse en los teleósteos dos grandes patrones de distribución de estas hormonas, uno en el cerebro anterior y el otro en el cerebro medio (Guilgur, *et al*, 2006), es

fundamental el conocer para una especie en particular como se presentan sus isoformas de GnRH.

Finalmente, *Chirostoma humboldtianum* constituye la pesquería más importante en términos de valor, con una gran demanda regional. Su importancia también se ubica en el ámbito ecológico dado que son especies nativas y endémicas de ambientes lacustres de la Mesa Central de México, de manera que no existen en ningún otro lugar del mundo (Rojas y Sasso, 2005). El pescado blanco tiene entonces importancia cultural, ecológica y económica, pero enfrenta una serie de problemas que ponen en peligro su permanencia y que se podrían resolver con la contribución de este estudio.

VIII. CONCLUSIONES

En el pescado blanco *Chirostoma humboldtianum* la distribución de la isoforma de GnRH de salmón o sGnRH se localizó en el cerebro anterior, específicamente, en el núcleo preóptico periventricular, el núcleo preóptico magnocelular y en la hipófisis.

1.- APÉNDICE 1

Amortiguador de formaldehído con picrato

(Stefanini *et al*, 1967).

Paraformaldehído.....20g
Acido picrico (solución acuosa saturada, filtrada).....150ml

Calentar a 60°C, añadir de 2 a 5 gotas de hidróxido de sodio acuoso 1.0 M (4%), necesario para disolver el paraformaldehído. Filtrar, enfriar y llevar a 1000 ml con el siguiente amortiguador de fosfatos.

Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$)..... 3.31g

Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)..... 17.89g

Agua llevar a 1000ml.

Nota: El pH es 7.3 este fijador es estable por más de 12 meses a temperatura ambiente, el picrato no precipita las proteínas en solución neutra y las razones por que se improvisa la preservación de la estructura y antigenicidad no se conocen.

IX. LITERATURA CITADA.

Adams, B. A., Vickers, E. D., Warby, C., Park, M., Fischer, W. H., Grey Craig, A., Rivier, J. E., Sherwood, N. M. 2002. Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis*. Biol. Reprod. 67:232–239.

Adelman, J.P., Mason, A.J., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H. 1986. Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:179-183.

Agulleiro B, García-Hernández MP, García Ayala A (2006) Teleost adenohypophysis: morphofunctional and developmental aspects. In: Reinecke M, Zaccone G, Kapoor BG (eds) Fish endocrinology. Science Publishers, New Hampshire, pp 290–324

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., Hyodo, S., Kitamura, S., Ikuta, K., Susuki, Y., Urano, A., Aida, K. 1995 a. Salmon GnRH synthesis in the preoptic area and the ventral telencephalon is activated during gonadal maturation in female masu salmon. Gen. Comp. Endocrinol. 99 : 13-21.

Amano, M., Oka, Y., Yamanome, T., Okuzawa, K., Yamamori, K. 2002a. Three GnRH systems in the brain and pituitary of a pleuronectiform fish, the barfin flounder *Verasper moseri*. Cell. Tissue. Res. 309:323-329.

Amano, M., Okubo, K., Ikuta, K., Kitamura, S., Okusawa, K., Yamada, H., Aida, K., Yamamori, K. 2002b. Ontogenic origin of salmon GnRH neurons in the ventral telencephalon and the preoptic area in masu salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127 : 256-262.

Amano, M., Ikuta, K., Kitamura, S. 2007. Effects of a gonadotropin-releasing hormone antagonist on gonadotropin levels in masu salmon y sockeye salmon. *J. Exp. Zool.* 307 : 535-541.

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.

Anglade I., Zandbergen T., Kah O. 1993, Origin of the pituitary innervations in the goldfish. *Cell Tissue Res.* 273: 345-355.

Anderson, L. 1996. Intracelular mechanisms triggering gonadotropin secretion. *Rev. Reprod.* 1: 193-202.

Barbour, C.D. 1973. The systematic and evolution of genus *Chirostoma Swainson* (Pisces: Atherinidae) *Tulane Stud. Zool. Bot.* 18: 97-141.

Barry, J., Dubois, M.P., 1974. Immunofluorescence study of the preopticoinfundibular LH-RH neurosecretory pathway of the guinea pig during the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 15: 200–208.

Batten, T.F., Cambre. M.L., Moons.,L., Vandesande. F. 1990. Comparative distribution of neuropeptide immunoreactive systems in the brain the green molly, *Poecilia latipinna*. *J Comp Neurol.* 302: 893-919.

Behrens, U.D., Douglas, R.H., Wagner, H.J. 1993. Gonadotropin-releasing hormone a neuropeptide of efferent projections to the teleost retina induces light-adaptive spinule formation on horizontal cell dendrites in dark adapted preparations kept in vitro. *Neurosci Lett.* 164: 59-62.

Bernstein, J.J. 1970. Anatomy and physiology of the central nervous system. In *Fish physiology*. Ed. Hoar W.S. y Randall D.J. Academic Press N.Y.

Blomenrohr, M., Heding, a., Sellar, R., Leurs, R., Bogerd, J., Eidne, K.A., Willars, G.B. 1999. Pivotal role for the cytoplasmic carboxyl terminal tail of a nonmammalian gonadotropin-releasing hormone receptor in cell surface expression, ligand binding, and receptor phosphorylation and internalization. *Mol. Pharmacol.* 56: 1229-1237.

Carolsfeld, J., Powell, J. F. F., Park, M., Fischer, W. H., Craig, A.G., Chang, J. P., Rivier, J. E., Sherwood, N. M. 2000. A novel form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in herring sheds light on evolutionary pressures. *Endocrinology* 141:505–512.

Cerdá-Reverter, J.M., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J.A. 2001a. Cytoarchitectonic study of the brain of a Perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. *J. Morphol.* 247: 217-228.

Cerdá-Reverter, J.M., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J.A. 2001b. Cytoarchitectonic study of the brain of a Perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The diencephalon. *J. Morphol.* 247: 229-251.

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

Chen, C.C., y Fernald R.D. 2008. GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. *J. Fish. Biol.* 73: 1099-1120.

Chi, I., Zhou, W., Prikhozhan, A., Flanagan, C., Davidson, J.S., Golembo, M., Illing, N., Millar, R.P., Sealfon, S.C., 1993. Cloning and characterization of the human GnRH receptor. *Mol.Cell. Endocrinol.* 91: R1-R6.

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

Dyer, B.S., Chernoff, B.1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei: Atherinimorpha). *Zool.J.Linn.Soc.* 117: 1-69.

Eckert, R. Randall, D., y Agustine, G. 1990. *Fisiología Animal: Mecanismos y adaptaciones.* 3ra. Ed. Ed. Interamericana McGraw-Hill. México. pp.293-298.

Espinosa, M.J., y Labarta, V. 1986. *Reproducción en acuicultura.* Comisión asesora de investigación científica y técnica. Madrid, España. pp. 5-28.

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

Flanagan, C.A., Chen, C.C. Coetsee, M., Mamputha, S., Witlock, K.E., Bredenkamp, N., Grosenick, L., Fernald, R.D., Illing, N. 2007. Expression, structure, function, and evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors GnRH-R1SHS and GnRH-R2 PEY in the teleost, *Astatotilapia burtoni*. *Endocrinology.* 148 : 5060-5071.

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 prepro-GnRH (gonadotrophin releasing hormone) messengers in the brain

of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Comparative Neurology 429:144–155.

González- Martínez, D., Zmora, N., Mañanos, E., Saligaut, D., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Kah, O., Muñoz-Cueto, J.A. 2002a. Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs (Gonadotropin-releasing hormones) in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies against recombinant GAPs. J. Comp. Neurol. 446 : 95-113.

González - Martínez, D., Zmora, N., Zanuy, S., Sarasquete, C., Elizur, A., Kah, O., Muñoz- Cueto, J.A. 2002b. Developmental expression of three different prepro-GnRH (gonadotropin- releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Chem. Neuroanat. 23 : 255-267.

Gorman, A., Sower, S.A. 2003. Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) Biology. Gen. Comp. Endocrinol. 134: 207-213.

Goos, H.J., De Leeuw R., De Zoeten-Kamp. C., Peute. J., Blahser. S. 1985. Gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neuronal structures in the brain and pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Cell. Tissue. Res. 241: 593-596.

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

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

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

Guilgur, L. G. 2008. Capítulo II. Sistemas GnRHérgicos en el pejerrey: localización neuroanatómica. En Tesis Doctoral. Universidad Nacional de General San Martín, Chascomús, Provincia de Buenos Aires, Argentina. pp 76-104.

Habibi, H.R., Peter, R.E., Sokolowska, M., Rivier, J.E., Vale, W.W. 1987. Characterization of gonadotropin releasing hormone (GnRH) binding to pituitary receptors in goldfish (*Carassius auratus*). *Biol Reprod* 36: 844-853.

Hofmann, H. A. 2006. Gonadotropin - releasing hormone signaling in behavioral plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16: 343-350.

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.

Kah, O., Breton, B., Dulka, J.G., Nuñez-Rodríguez. J., Peter, R.E., Corrigan, A., Rivier, J.E., Vale, W.W. 1986. A reinvestigation of the GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon GnRH. *Cell Tissue Res* 244:327-337.

Kah, O., Zanuy, S., Mañanós, E., Anglade, Y., Carrillo, M. 1991. Distribution of salmon gonadotropin releasing-hormone in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Cell Tissue Res*; 266:129-136

Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L.G., Vaillant, C., Lareyre, J.J. 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoan : A historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153: 346-364.

Kasper, R.S., Shved, N., Takahashi, A., Reinecke, M., Eppler, E. 2006. A systematic immunohistochemical survey of the distribution patterns of GH, prolactin, somatolactin, β -TSH, β -FSH, β LH, ACTH, and α -MSH in the adenohypophysis of *Oreochromis niloticus*, the Nile tilapia. *Cell. Tis. Res.* 325: 303-313.

Karnik, S. S., Gogonea, C., Patil, S., Saad, Y., Takezako, T. 2003. Activation of G-protein –coupled receptor: a common molecular mechanism. *Trends. End. Metab.* 9:431-437.

Kim, M., Oka, Y., Amano, M., Kobayashi, M., Okuzawa, K., Hasegawa, Y., Kwashima, S., Suzuki, Y., Aida, K. 1995. Immunocytochemical localization of sGnRH and cGnRH-II in the brain of golfish, *Carassius auratus*. *J. Comparative Neurology.* 356 :72-82.

Leonardelli, J., Barry, J., Dubois, M.P., 1973. Demonstration by fluorescent antibody technical of a substance immunologically related to LHRF in hypothalamus and median eminence in mammals. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D* 276, 2043–2046.

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

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

Lin, X.W., Lin, H.R., Peter, R.E. 1994. Seasonal variations in gonadotropin responsiveness, self-priming, and desensitization to GnRH peptides in the common carp pituitary in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93 : 275-285.

Lin, X.W., Peter, R.E. 1996. Expression of salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II precursor messenger ribonucleic acids in the brain and ovary of goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101 :282-296.

Madigou, T., Mañanos-Sanchez, E., Hulshof, S., Anglade, I., Zanuy, S., Kah, O. 2000. Cloning, tissue distribution, and central expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor in the rainbow trout. (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 63 : 1857-1866.

Mackenzie. D.S., D.R. Gould, R.E., Peter, J.E.Rivier., W. Vale. 1984. Response of superfused goldfish pituitary fragments to mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones. *Life Sci.* 35 : 2019-2026.

Marshall, J.C., Shakespear, R.A., Odell, W.D. 1976. LHRH-pituitary plasma membrane binding: the presence of specific binding sites in other tissues. *Clin Endocrinol*: 5: 671-677

Martoja, R. 1970. *Técnicas de histología animal*. Ed. Toray-Mason. Barcelona España. pp 1-5, 7-9

Maudsley, S., Davidson, I. Pawson, A.J., Chan , R., De Maturana, R.L., Millar, R.P. 2004. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists promote proapoptotic signaling in peripheral reproductive tumor cells by activating a Galphai-coupling state of the type GnRH receptor. *Cancer Res.* 64 : 7533-7544.

Matsuo, H., Baba, Y., Fair, R.M., Arimura, A., Schally, A.V. 1971. Structure of the porcine 1h and fish-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 1334-1339.

Matsumaya,M., Adachi, S., Nagahama, Y., Matsuura, S., 1991. Annual reproductive cycle of the captive female japanese sardine *Sardinops*

melanostictus: relationship to ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones. Mar. Biol. 108: 21-29.

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

Méndez- Sánchez, J.F., Soto, G.E., Paulo-Maya, J. 2002. Ictiofauna del estado de México. Ciencia. Ergo. Sum. 9: 87-90.

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

Millar, R.P., Lu, Z.L., Pawson, A.J., Flanagan, C.A., Morgan, K., Maudsley, S.R. 2004. Gonadotropin-releasing hormone receptors. Endocrine Rew. 25: 235-275.

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. U.S.A. 81:3874–3878.

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

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

Montaner, A. D., Park, M., Fischer, W. H., Craig, A. G., Chang, J. P., Somoza, G. M., Rivier, J. E., Sherwood, N. M. 2001c. Primary structure of a novel

gonadotropin-releasing hormone (GnRH) variant in the brain of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Endocrinology* 142:1453–1460.

Muske, L.E. 1993. Evolution of gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuronal systems. *Brain Behavior.Evol.* 42 :215-230.

Ngamvongchon, S., Lovejoy,D. A., Fischer,W. H., Craig,A.G., Nahorniak, C. S., Peter,R. E., Rivier, J. E., Sherwood, N. M. 1992. Primary structures of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 3:7–22.

Ogawa,S., Akiyama,G., Kato,S., Soga,T., Sakuma,Y., Pahar.I.S. 2006. Immunoneutralation of gonadotropin-releasing hormone type-III supresses male reproductive behavior of ciclids. *Neurosci Lett.* 403 :201-205.

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., Sakai, F., Lau, E.L., 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 Kallman syndrome. *Endocrinology.* 147 : 1076-1084.

Okubo, K., y Nagahama, Y. 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiol.* 193 :3-15.

Paulo-Maya J.G., Figueroa, L., , Soria-Barreto M. 2000. Peces dulceacuícolas mexicanos XIX *Chirostoma humboldiatum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *ENCB-IPN. Zool. Inf.* 43: 59-74.

Palevith, O., Kight, K., Abraham, E., Wray, S., Zohar, Y., Gothilf, Y. 2007. Ontogeny of the GnRH. Systems in zebrafish brain: in situ hybridization and promoter-reporter expression analyses in intact animals. *Cell. Tissue. Res.* 327: 313-322.

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

Peter, R. E., Gill, V.E. 1975. A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.* 159 : 69-102.

Peter, R.E., Nahorniak, C.S., Sokolowska, M., J.P. Chang, J.E., Rivier J.E., Vale, W.W., King, J.A., Millar, R.P. 1985. Structure- activity relationships of mammalian, chicken, and salmon gonadotropin-releasing hormones *in vivo* in goldfish. *Gen. Com. Endocrinol.* 58 : 231-242.

Peter, R.E., Yu, K.L., Marchant, T.H., y Rosenblum, P.M. 1990. Direct neural regulation of the teleost adenohypophysis. *J. Exp. Zool. Suppl.* 4:84-89.

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

Powell, J.F.F., Kirveckl, S.L., Collins, P.M., Sherwood, N.M. 1996. Molecular forms of GnRH in the three model fishes: rockfish, medaka and zebrafish. *J. Endocrinol.* 150: 17-23.

Prassada Rao, P.D. 1999. Hypophysiotropic neurons in the brain of teleost. In: Prassada Rao, P.D., Peter R.E., editors. Neural regulation in the vertebrate endocrine system. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. P23-40.

Rodríguez-Gómez, F.J., Rendón, M.C., Sarasquete, C., Muñoz-Cueto, J.A. 1999. Distribution of gonadotropin-releasing hormone immunoreactive systems in the brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. Histochem J; 31:695-703.

Rodríguez, L., Carrillo, M., Sorbera, L.A., Soubrier, M.A., Mañanós, E., Holland, M.C., Zohar, Y., Zanuy, S. 2000. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during sex differentiation and first spawning season. Gen Comp Endocrinol. 120:67-74.

Rojas, C.P.M., Sasso, Y.L.F. 2005. El pescado blanco. Rev. Dig. Univ. 8: 2-18.

Ronchi, E., Aoki, c., Krey, L.C., Pfaff, D.W. 1992. Immunocytochemical study of GnRH and GnRH-associated peptide in male Syrian hamsters as a function of photoperiod and gonadal alterations. Neuroendocrinology. 55: 134-145.

Ruf, F., Sealson, S.C. 2004. Genomics view of gonadotrope signaling circuits. Trends. Endocrinol. Metabol. 7: 332-338.

Sarnat, B.H., Netsky, M.G., Anadon, A.R., Machin, C., Zapata, A. 1976. Evolución del sistema nervioso. H. Blume. Madrid España. P. 408.

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

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

Sherwood, N.M., Lovejoy, D.A., Coe, I.R. 1993. Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocr. Rev.* 14 : 241-254.

Sherwood, N.M., Adams, B.A., Tello, J.A., 2005. Endocrinology of protochordates. *Can. J. Zool.* 83, 225–255.

Smith, G.R., Stearley, R.F., 1989. The classification and scientific names of rainbow and cutthroat trouts. *Fisheries.* 14 : 4-10.

Somoza, G.M., Miranda, L.A., Strobl-Mazzulla, P., Guilgur, L.G. 2002. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH): From fish to mammalian brains. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22 : 589-609.

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

Stefanini, M., De Martino, C., Zamboni, L. 1967. Buffer formaldehyde with picarte. 29-30. In *Histological and Histochemical methods*. Ed. By Kiernan, J. A. Pergamon press. New York. (1990).

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

Subheader, N., Rama Krishna, N.S. 1988. Immunocytochemical localization of LH-RH in the brain and pituitary of the catfish, *Clarias batrachus* (Linn). Gen Comp Endocrinol 72: 431-444.

Taylor y Burns, 1974. Localisation of immunoglobulins in paraffin sections of formaldehyde fixed tissues. In Techniques in clinical immunology. Ed. By Thompson R.A. Blackwell Scientific publication Oxford. 1981.

Temple, J.L., Millar, R.P., Rissman, E.F. 2003. An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior. Endocrinology. 144 :13-19.

Tensen, C., Okuzawa, K., Blomenrohr, M., Rebers, F., Leurs, R., Bogerd, J., Schulz, R., Goos, H. 1997. Distinct efficacies for two endogenous ligands on a single cognate gonadoliberin receptor. Eur. J. Biochem. 243 :134-140.

Tsai, P.S. 2005. Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: structure, function, and evolution. Gen. Comp. Endocrinol. 148: 48–53.

Torrey, T.W. 1978. Morfogénesis de los vertebrados. 3a. Limusa. México. 457-534.

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

Troskie, B.E., Hapgood, J.P., Millar, R.P., Illing, N. 2000. Complementary deoxiribonucleic acid cloning, gene expression, and ligand selectivity of a novel gonadotropin-releasing hormone receptor expressed in the pituitary and midbrain of *Xenopus laevis*. Endocrinology. 141 : 1764-1771.

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

Van Oordt, P.G.W.J., y Peute, J. 1983. The cellular origin of pituitary gonadotropins in teleosts. En W.S. Hoar, D.J. Randall y E.M. Donaldson, eds. *Fish Physiology*, vol. IX. pp. 137-186. Academic Press, New York.

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

Weltzien, F.A., Andersson, E., Andersen, O., Shalchian-Tabrizi, K., Norberg, B. 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). Review. *Comp Biochem Physiol A* 137:447-477

Weilt, C.P., Hansen, D., Hyan, F., Le Gac, B. Breton., L.W..Crim. 1986. Use of pituitary cells in primary culture to study the regulation of gonadotropin hormone (Gth) secretion in rainbow trout: Setting up and validating the system as assessed by its responsiveness to mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62: 202-209.

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

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

White, R.B., Eisen, J.A., Kasten, T.L., Fernald, R.D. 1998. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 305-309.

Wong, T.T., Gothilf, Y., Zmora, N., Kight, K.E., Meiri, I., Elizur, A., Zohar, Y. 2004. Developmental expression of three forms of gonadotropin-releasing hormone and ontogeny of the hypothalamic-pituitary-gonadal-axis in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biol. Reprod.* 71: 1026-1035.

Yamada, H., Amano, M., Okuzawa, K., Chiba, H., Iwata, M. 2002. Maturational changes in brain contents of salmon GnRH rainbow trout as measured by a newly developed time resolved fluoroimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126: 136-143.

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

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

Yoshida, K., Tobet, S.A., Crandall, J. E., Jimenez, T.P., Schwarting, G.A. 1995. The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve. *J. Neuroscience.* 15: 7769-7777.

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

Yu, K.L., Sherwood, N.M., Peter, R.E. 1988. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides* 9: 625-630.

Yu, K.L., He, M.L., Chik, C.C., Lin, X.W., Chang, J.P., Peter, R.E. 1998. mRNA expression of gonadotropin releasing hormones (GnRHs) and GnRH receptor in goldfish. *Gen Comp Endocrinol*; 112(3):303-11.