



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Distribución del Polipéptido Activador de la Adenilato

Ciclase de la Pituitaria (PACAP) en gónadas de

Chiostoma humboldtianum.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

Presenta:

ANAHÍ GONZÁLEZ BERNAL

Director de Tesis: Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas.

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi mamá; Mami en estas líneas quiero expresarte mi eterno agradecimiento porque has estado conmigo en las buenas y en las malas, gracias por darme la oportunidad de haber estudiado esta carrera que me ha llenado de tantas satisfacciones, sabes de antemano que sin tu apoyo, amor y dedicación, yo no estaría en donde estoy ahora. Gracias por ser mi madre, por darme siempre un gran ejemplo de vida y porque en ti encuentro todas las respuestas que deseo escuchar, a ti te dedico este trabajo.

A mi papá; a la persona que admiro por la fortaleza espiritual y por la inteligencia innata que posee, eres sin duda una parte fundamental de lo que hoy me conforma, yo te quiero agradecer todos los cuestionamientos que me has hecho y que me han aportado gran sabiduría, eres sin duda mi maestro de vida, eres la brújula que siempre va a marcar mi camino. Te quiero papá.

A mi hermano Jesús; que al momento de nacer complementó mi vida, aunque no lo creas de ti he aprendido muchas cosas y te admiro por tu fortaleza, por tu habilidad para resolver cosas que nos han sacado de muchos apuros, te admiro por ser la mano derecha de mi papá, y sé de antemano que vas a llegar muy lejos en la vida a pesar de los varios tropiezos que se te puedan presentar con el paso del tiempo. Te quiero y sé que siempre vamos a estar juntos.

A mi hermano Ricardo; que a pesar de ser el más joven de los tres, nos ha dado ejemplos muy valiosos de vida, en ti encuentro a una persona muy valiente de la que admiro su sinceridad, su imaginación, su determinación y la forma tan perfecta en la que

llega a expresar sus sentimientos. Te quiero mucho hermano y deseo de todo corazón que el amor que nos tenemos entre los tres dure para siempre y que nuestros lazos permanezcan unidos como hasta ahora.

A mi abuela; que es la columna vertebral de la familia, es sin duda un ejemplo de mujer y es la primera persona a la que agradezco su existencia porque sin ella simplemente yo no estaría aquí. Te deseo muchos años más de vida, para así poder seguir escuchando tus anécdotas y llenarme de tu sabiduría que es tan valiosa para mí.

A mi novio Daniel: del que he recibido solo lo mejor, del que estoy profunda y totalmente enamorada, del que he aprendido muchas cosas tanto profesionales como de la vida cotidiana, sabes que eres parte de mi vida así como de todo mi trabajo, ninguna de estas hojas ha sido terminada sin que un pensamiento (del que obviamente eres el personaje principal) llegara, estremeciera mi cuerpo e hiciera latir mas rápido mi corazón, gracias por estar a mi lado y darme fuerza día con día, también por darme la felicidad absoluta con tan solo un beso. Gracias mi amor.

A mis compañeras y amigas. Ale, Beta y Luz, con las que compartí experiencias e intercambio de opiniones, con las que la vida en el laboratorio fue mucho más fácil, deseo con toda sinceridad que nuestra amistad no sea efímera y que sigamos pasando momentos increíbles, también aprovecho estas líneas para desearles lo mejor en la vida, se que van a lograr todas sus metas y que van a tener una vida llena de satisfacciones.

Agradecimientos.

Al Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas, por la transmisión de su invaluable conocimiento y por la calidad de ser humano que posee, así mismo agradezco los consejos y experiencias que enriquecieron este trabajo.

M. en C. Mónica Chávez Maldonado, por la ayuda brindada en la elaboración de las técnicas utilizadas en el presente trabajo y por los comentarios acerca del mismo.

Dra. Juana Alba Luis Díaz, le agradezco el tiempo dedicado a la revisión de este documento, así como las recomendaciones para el mejoramiento del mismo.

Biol. José del Carmen Benítez Flores, por las varias acotaciones que sin duda fueron fundamentales para la consumación de este trabajo.

Biol. Beatriz Macedo Garzón, por su valiosa amistad y por la ayuda incondicional brindada para la conclusión de mi tesis.

Índice

Resumen	VI
1. Introducción	1
1.1 Aspectos generales	1
1.2 Antecedentes	4
1.2.1 PACAP en la zona reproductiva femenina	7
1.2.2 PACAP en la zona reproductiva masculina	8
1.3 Generalidades de la especie de estudio	10
1.4 Anatomía e histología de las gónadas de <i>Chirostoma humboldtianum</i>	12
1.4.1 Características y proceso ovogénico del ovario de <i>Chirostoma humboldtianum</i> .	12
1.4.2 Descripción anatómica del testículo de <i>Chirostoma humboldtianum</i>	15
1.4.3 Características Morfológicas de las células del quiste Testicular	16
1.4.4 Escala histológicas de madurez gonádica del testículo de <i>Chirostoma humboldtianum</i>	17
2. Objetivos	18
3. Materiales y métodos	19
3.1 Obtención del tejido	19
3.2 Procesamiento del tejido	19

3.3 Inmunohistoquímica	20
4. Resultados	22
5. Discusión	28
6. Conclusiones	31
7. Referencias	32
Anexos	37

Resumen

El PACAP es un péptido, miembro de la superfamilia secretina/ hormona liberadora de la hormona de crecimiento/ glucagòn/ péptido intestinal vasoactivo. El PACAP produce sus efectos biológicos al unirse por lo menos a tres tipos de receptores: PAC1-R, VPAC1-R y VPAC2-R, todos ellos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, que tienen como característica el poseer siete dominios transmembranales. El PACAP y sus receptores han sido encontrados en varias áreas del sistema nervioso central y en órganos periféricos entre ellos, las gónadas. En peces, hay evidencias de que PACAP actúa como un factor hipofisiotrófico, regulando la secreción de hormonas de la hipófisis. En las gónadas, se ha determinado que también aumenta el AMPc en células de la granulosa y de Sertoli, y parece estimular la liberación de hormonas esteroides tanto en testículo como en ovario. Sin embargo, hasta la fecha, los estudios son de naturaleza fisiológica o registran la expresión de PACAP, no habiendo evidencia de la presencia del péptido en las gónadas de pez. En el presente estudio se estableció la distribución de PACAP las en gónadas de *Chirostoma humboldtianum*. Los peces fueron colectados en la laguna de Zacapu, Michoacán. Las gónadas fueron extraídas y fijadas en paraformaldehído al 2% y ácido pícrico, se deshidrataron con alcoholes graduales ascendentes para su posterior inclusión en paraplast. Se realizaron cortes transversales, los cuales fueron sometidos a la técnica de inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo específico para este péptido (anti-PACAP). Los cortes fueron montados y analizados al microscopio. En el testículo se encontró inmunorreacción a PACAP en espermatogonias y espermatocitos primarios, mientras que en ovario fue posible detectar una reacción

positiva en células de la granulosa y de la teca, durante la etapa vitelogénica. En el testículo de *Chirostoma*, la presencia de PACAP parece estar más vinculada con el desarrollo temprano y la diferenciación del linaje espermático. Mientras que en el ovario, nuestros resultados sugieren que PACAP pudiera estar vinculado a la esteroidogénesis, por su presencia en las células foliculares.

Introducción

1.1 Aspectos generales

El Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria (PACAP) es un péptido originalmente aislado de extractos hipotalámicos de oveja (Miyata *et al.*, 1989) y es miembro de la superfamilia secretina/ hormona liberadora de la hormona de crecimiento/ glucagón/ péptido intestinal vasoactivo (VIP). De todos los miembros de esta familia, la secuencia de PACAP es la más conservada filogenéticamente. (Vaudry *et al.*, 2000). Existen dos formas biológicamente activas: una de 38 y otra de 27 aminoácidos; éstos péptidos están amidados en su extremo carboxilo terminal. (Miyata *et al.*, 1989; Sherwood *et al.*, 2000).

La secuencia del PACAP se ha identificado en diferentes especies de vertebrados y de algunos invertebrados, como anélidos y tunicados. El PACAP de estas especies posee un alto grado de similitud con el PACAP del humano, teniendo una diferencia de entre uno y cuatro aminoácidos (Sherwood *et al.*, 2000). Este patrón de conservación en la secuencia de aminoácidos en las diferentes especies de animales de la escala filogenética demuestra la importancia biológica de este neuropéptido.

El PACAP produce sus efectos biológicos al unirse por lo menos a tres tipos de receptores: PAC1-R, VPAC1-R y VPAC2-R, todos ellos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G que tienen como característica el poseer siete dominios transmembranales (Harmar *et al.*, 1998). El receptor tipo I de PACAP, tiene una alta afinidad por PACAP 38 y PACAP 27, y muestra baja afinidad por VIP, mientras que

los receptores tipo II a PACAP (VPAC1-R y VPAC2-R) tienen similar afinidad por PACAP38, PACAP 27 y VIP (Ishihara *et al.*, 1992, Hashimoto *et al.*, 1993, Lutz *et al.*, 1993). Estos receptores estimulan la actividad de la adenilato ciclasa y ello, resulta en un incremento de los niveles intracelulares de AMPc. PAC1-R también activa la vía de la fosfolipasa C, esto incrementa los niveles de inositol 1, 4, 5 trifosfato y eleva los niveles de Ca^{2+} Intracelular (Moretti *et al.*, 2002).

El PACAP y sus receptores han sido encontrados en varias áreas del sistema nervioso central, incluido el hipotálamo, corteza, bulbo olfativo, hipocampo, y en otros órganos periféricos como, la hipófisis, el pulmón, las glándulas adrenales, el testículo y el ovario (Ok *et al.*, 2003). En vertebrados inferiores, especialmente en peces, hay evidencias de que PACAP actúa como un factor hipofisiotrópico, regulando la secreción de hormonas de la hipófisis (Wang *et al.*, 2003). También, regula la vasodilatación, la activación de la motilidad intestinal, incrementa la secreción de insulina e histamina y estimula la multiplicación y diferenciación celular (Ramírez *et al.*, 2004).

Los mRNAs del PACAP han sido encontrados en las células germinales de la rata. En hembras de esta especie, el PACAP estimula de manera dosis dependiente la acumulación de AMPc, la secreción de estradiol y de progesterona por parte de las células de la granulosa en cultivos ováricos, así como una posible inducción de la respuesta a LH en estas mismas células. Estudios en pez cebra han demostrado que PACAP participa en el proceso de foliculogénesis (Wang *et al.*, 2003).

En el testículo de rata, estimula la acumulación de AMPc y la secreción de lactato, estradiol e inhibina en células de Sertoli (Arimura *et al.*, 2003). Algunos estudios sugieren

que PACAP participa en el desarrollo testicular y puede expresarse dependiendo de la edad del individuo (Ok., *et al* 2003).

1.2 Antecedentes

En 1994, Shioda, *et al.*, demostraron en testículo de rata madura, la presencia de PACAP en células germinales, en espermatogonias, espermátocitos y especialmente, en las espermátides. La presencia más activa de PACAP se observó en las espermátides durante el desarrollo en los estadios VII y VIII.

Krempels, *et al.*, en 1995 utilizaron el receptor VIP-2, dentro de algunas secciones representativas de los túbulos seminíferos. Los resultados *in situ*, usando la polimerización en cadena de la transcriptasa reversa (RT-PCR), han permitido sugerir que el PACAP tiene efecto parácrino en el testículo de rata a través del receptor VIP-2.

Estudios posteriores llevados a cabo por Philip *et al.*, en el 2000 por medio de RT-PCR demostraron la expresión del gen de PACAP durante el ciclo espermatogénico, en secciones aisladas de túbulos seminíferos, e identificaron intensa actividad en las espermátides postmeióticas durante las etapas de desarrollo I y VIII, estableciendo así, la existencia de un promotor especializado del gen de PACAP cuya actividad se regula durante el ciclo espermatogénico.

En el 2003 Koh *et al.*, investigaron la expresión de PACAP en testículo de ratas inmaduras, los mARNs de PACAP y sus proteínas fueron expresadas en diferentes tipos celulares a diferentes tiempos. Lo que sugiere que PACAP contribuye para el crecimiento y diferenciación celular, esto soporta la idea de que PACAP actúa como un factor de crecimiento durante el desarrollo testicular.

Con estudios realizados sobre de la expresión del gen del PACAP por RT-PCR en el ovario de rata, se demostró que las isoformas de PACAP y de su receptor (PACAP 1- R) son expresadas en el ovario, donde podrían ejercer una acción parácrina o autocrina en células de la granulosa (Scaldaferri *et al.*, 1996).

Posteriormente, Koh *et al.*, en el 2000, demostraron que el PACAP actúa como pararegulador o autorregulador a través del receptor tipo 1 en células de la granulosa y en el cúmulo de células de los folículos preovulatorios. Todo esto, indica que el PACAP tiene un papel importante en la preparación de la ovulación. Estudios mas recientes llevados a acabo por Wang *et al.*, en el 2003 identificaron un nuevo tipo de PACAP en el pez cebra (zf) PACAP38-2 y observaron que PACAP, estimula la maduración de los ovocitos, así como la expresión de folistatina en células ováricas del folículo del pez cebra. Los resultados sugieren que PACAP es un factor ovárico que regula la acción de las gonadotropinas.

En 2006 Vaccari *et al.*, mostraron la expresión de los tres tipos de receptores a PACAP en los ovarios de ratas no maduras y tratadas con gonadotropinas. En un análisis más detallado en células foliculares preovulatorias, se demostró que PAC1-R y VPAC2-R fueron expresados en células de la granulosa, mientras que solamente los receptores del VIP fueron expresados en células de la teca.

En 2009, Huang *et al.*, utilizando la técnica inmunohistoquímica y RT-PCR revelaron la expresión de PACAP38 y el receptor Pac1-Ren una amplia gama de tejidos de tilapia (*Oreochromis mossambicus*) incluyendo las gónadas, sugiriendo que PACAP puede mediar la acción de las gonadotropinas por mecanismos autocrinos/parácrinos en este

pez. En el mismo año Gras *et al.*, demostraron por medio de RT-PCR que PACAP es expresado de manera transitoria en los ovarios de la rata durante el periodo periovulatorio, y se observó la presencia de este péptido en células de la granulosa de folículos periovulatorios, también se presentó reacción en células de la teca de folículos maduros e inmaduros y en células glandulares e intersticiales.

1.2.1 PACAP en la zona reproductiva femenina.

PACAP puede interactuar con la red local y sistémica de factores involucrados en los diferentes estados del desarrollo folicular y en la diferenciación del cuerpo lúteo. La coincidente expresión ovárica de PACAP y sus múltiples variantes de receptor indican que PACAP puede modular la proliferación y diferenciación de células ováricas a diferentes niveles. *In vitro*, PACAP estimula la proliferación de células germinales primordiales de ratón, los precursores embrionarios de los gametos adultos, y células somáticas gonadales por medio de la activación de AC vía receptores PAC1. Esto indica que PACAP puede ser un importante regulador de la función gonadal embrionaria. (Fig. 1)

La posibilidad que PACAP ejerza acciones autocrinas y/o paracrinas durante la producción periovulatoria de progesterona inducida por LH y la diferenciación del cuerpo lúteo está indicada por su producción y secreción de células de granulosa-luteína *in vitro*. Estas células responden a PACAP con un rápido y dosis dependiente incremento en la acumulación de progesterona. Este efecto está mediado por variantes del receptor PAC1, que son abundantes en células ováricas de mamífero durante el período preovulatorio. La expresión inducida por gonadotropina de mRNA que codifica PACAP en células de granulosa de folículos está mediada por AMPc. Además, la habilidad de PACAP38 para suprimir la fragmentación apoptótica del DNA indica que PACAP puede proteger folículos preovulatorios de la muerte apoptótica.

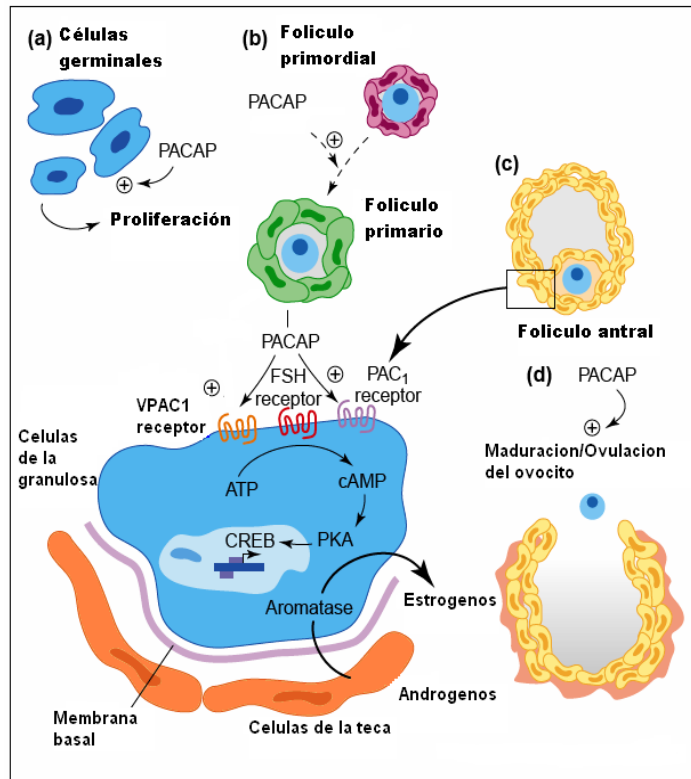


Fig. 1.- Posible papel local de PACAP en diferentes etapas del desarrollo folicular. a) PACAP afecta la proliferación de células primordiales de ratón. b) PACAP podría obrar recíprocamente con otros factores intraovarios que están involucrados en el reclutamiento de folículos primarios. c) En el folículo antral FSH dependiente, las células de la granulosa actúan a PACAP. Este péptido puede modular la PKA, limitando las concentraciones de AMPc en diferenciación de células de la granulosa. d) En la etapa preovulatoria PACAP afecta el balance entre la detención y la maduración meiótica del ovocito en el folículo preovulatorio. Modificado de Moretti *et al.*, 2002

1.2.2 PACAP en la zona reproductiva masculina

En testículos de mamífero, PACAP se expresa en células germinales e intersticiales. (Fig. 2) PACAP incrementa los niveles de AMPc extracelular e intracelular, en diferentes tipos celulares testiculares específicos, con potencias desiguales.

PACAP es también un potente regulador de la espermatogénesis testicular. Receptores Pac1 han sido descritos en células de Leydig, donde PACAP activa a AC, PLC y la

transducción de señales acopladas a un canal de Na⁺ a través de una proteína G. Células Leydig fetales de rata responden a bajas concentraciones de PACAP, que puede ser un importante regulador fisiológico de su función antes del incremento de la secreción de LH por la pituitaria. PACAP27 y PACAP38 incrementan la producción de AMPc y testosterona en células Leydig dispersas de ratas embrónicas, indicando que PACAP puede regular la actividad temprana de células Leydig.

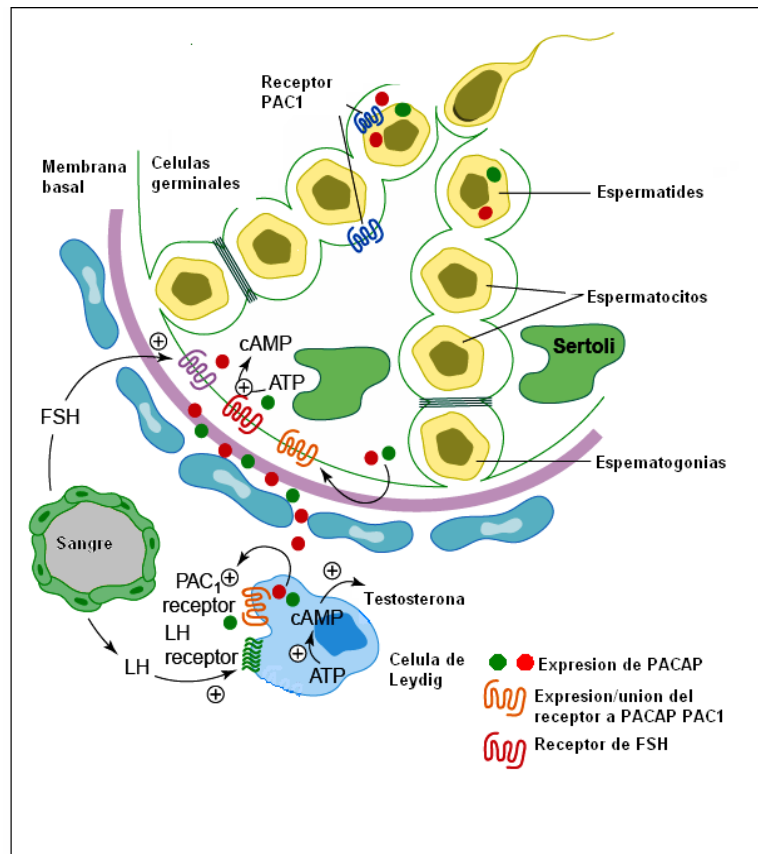


Fig. 2.- Posible papel local de PACAP como un regulador autocrino y parácrino de la actividad gonadal masculina. FSH y LH regulan la actividad sobretodo de los túbulos seminíferos y células de Leydig respectivamente. PACAP intratesticular se ata al receptor PAC1 y activa los sistemas del segundo mensajero que afectan la gametogénesis y la esteroidogénesis. Modificado de Moretti *et al.*, 2002

1.3 Generalidades de la especie en estudio

En México el género representativo de la familia *Atherinopsidae* es *Chirostoma*, está constituido por diversas especies conocidas con los nombres comunes de charal, charal negro, boquerón y pescado blanco (Aguilar y Navarrete, 1996 - 1997). Este género es endémico de las aguas dulces de México, se originó de formas marinas que invadieron la zona central del país y por radiación adaptativa se diferenciaron (Fig. 3).

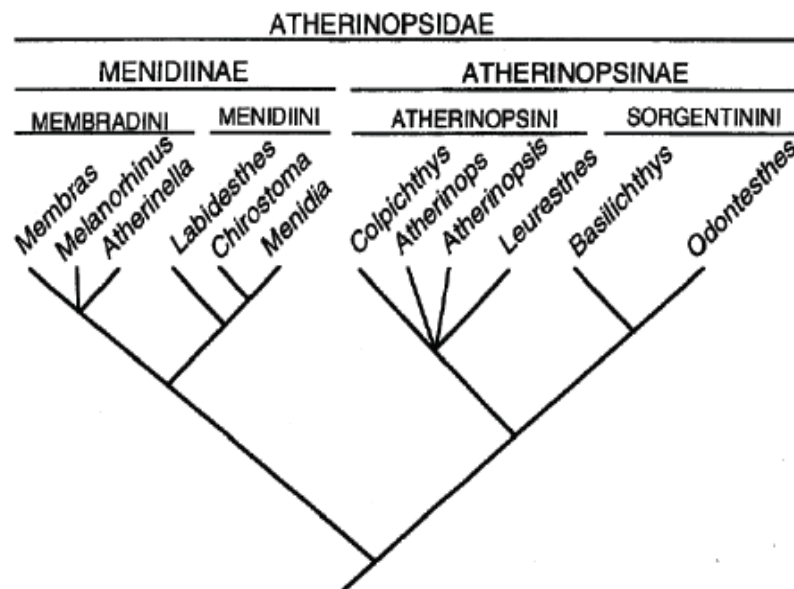


Fig. 3.- Relaciones filogenéticas entre géneros de la familia *Atherinopsidae* (Dier y Chernoff, 1996)

Las características morfológicas como son: el tamaño del cuerpo, la longitud de la mandíbula, los patrones de dentición y la presencia de tubos o canales en las escamas de la línea lateral, permiten distinguir a las diversas especies (Barbour *et al.*, 1973). *C. humboldtianum*, (Fig. 4) es una de las especies con mayor área de distribución natural y parece haber dado origen a la mayoría de los otros miembros del grupo, (Barbour *et al.*, 1973). En la actualidad esta especie se encuentra amenazada por la reducción de sus

poblaciones y la degradación de su hábitat natural (Figuroa- Lucero *et al.*, 2004). Es una especie de gran importancia cultural y económica, al ser utilizada durante décadas como alimento por las poblaciones localizadas alrededor de los lagos de Pátzcuaro y de Chapala, así como embalses del Estado de México (Aguilar y Navarrete., 1996- 1997). Algunas especies como el Pez blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*) o el pez blanco de Chapala (*Chirostoma chapalichties*) y el pez blanco o pez blanco del altiplano (*Chirostoma humboldtianum*) han sido ampliamente utilizados para la alimentación humana desde tiempos prehispánicos (Rojas y Sasso, 2005).



Fig. 4. *Chirostoma humboldtianum*

Dentro de las especies nativas que tienen importancia por sostener fuertes pesquerías en los estados de Michoacán y Jalisco están los charales y pescados blancos, los cuales tienen un gran potencial piscícola en México. Los charales y pescados blancos gozan de una gran aceptación en la dieta del pueblo mexicano, sostienen importantes pesquerías y es factible su cultivo. En general, los atherínidos mexicanos han sido poco estudiados. En México, son pocos los estudios realizados sobre la biología de la reproducción y el

crecimiento, realizados con especies endémicas de peces. Los trabajos sobre el género *Chirostoma* han sido de taxonomía, distribución, desarrollo embrionario, hábitos alimenticios y pesquería (Paulo Maya *et al.*, 2000).

1.4 Anatomía e histología de las gónadas de *Chirostoma humboldtianum*.

1.4.1 Características y proceso ovogénico del ovario de *Chirostoma humboldtianum*.

Cárdenas R. *et al.*, en 2008 realizó un trabajo en el que describe las características y el proceso de ovogénesis del ovario de *Chirostoma humboldtianum*.

Los ovarios de *Chirostoma humboldtianum*, son órganos pareados y alargados, localizados a lo largo de la pared abdominal. En la parte posterior, los ovarios continúan en un gonoducto corto. Los ovarios no maduros son de color blanquizco con pequeños puntos negros debido a los melanóforos, los cuales proliferan durante el desarrollo y cubren toda la superficie; y como consecuencia, las gónadas se observan totalmente en oscuras. Los ovarios son de tipo asincrónicos y poseen diferentes tipos celulares durante el desarrollo. Internamente se distinguen lamelas, especialmente durante el crecimiento primario, en peces jóvenes. El proceso de la ovogénesis está dividido en cinco estadios: ovogénesis temprana (formación de nuevos ovocitos y folículos), crecimiento primario de los ovocitos, etapa cortical y del lípido, vitelogénesis, y maduración.

En el mismo trabajo se divide el desarrollo de los ovocitos en 5 etapas.

Ovogénesis temprana. (Tamaño: ~10-25 μm). En el ovario de adultos, las ovogonias son poco visibles porque están encerradas por las células epiteliales. Los ovocitos en meiosis, en estadio tardío, poseen pequeños grupos de células las cuales tienen un núcleo esférico, con un solo nucléolo, y una cantidad discreta de citoplasma con ribosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico. Las células del folículo comienzan a incluir el ovocito durante el proceso inicial de la meiosis.

Crecimiento primario del ovocito. (Tamaño: ~25-270 μm) La primera fase de crecimiento del ovocito comienza con la detención de la meiosis en diploteno. En este momento, el núcleo es esférico y se encuentra en una posición central. Inicialmente, los nucleolos se encuentran dispersos por todo el nucleoplasma. Los ovocitos poseen citoplasma altamente basófilo y solamente pocas estructuras pueden ser distinguidas como el retículo endoplásmico. Conforme el desarrollo del ovocito continúa y su tamaño aumenta, la basofilia disminuye y hay un mayor desarrollo de organelos membranosos, como el retículo endoplásmico rugoso (RER) y el aparato de Golgi que comienzan a ser evidentes. En las fases finales a esta etapa, el corión comienza a formarse. Algunas microvellosidades del ovocito pueden encontrarse alcanzando el espacio extracelular cerca de las células foliculares (de la granulosa), que son planas y forman un anillo de una sola capa. En los folículos jóvenes, las células de la granulosa contienen pocas mitocondrias y retículo endoplásmico. En el final de esta fase, sin embargo, hay cambios en la morfología debido al rápido crecimiento. Fuera del corión, el crecimiento de los filamentos empieza a distinguirse. Durante el resto de la ovogénesis, los filamentos

continúan creciendo y se enrollan alrededor del ovocito, aumentando su diámetro. Su función es atar al embrión en algún sustrato.

Crecimiento secundario del ovocito. (Tamaño: ~270-380 μm). Esta etapa comienza cuando los alvéolos corticales y las vesículas de lípido se forman. Las vesículas lipídicas son homogéneas, moderadamente electrodensas y tienen una superficie interna lisa. La acumulación de lípidos continúa, solo durante la vitelogénesis. Los alvéolos corticales están situados en la corteza periférica del ovocito. Dos clases de vesículas pueden ser distinguidas: una con un material homogéneo y otra con nucleótidos. Dentro del núcleo, la cromatina es muy granular. Las microvellosidades del ovocito están extendidas por todo del corión alrededor de las células de la granulosa. Durante esta etapa, las células de la granulosa cambian su morfología totalmente. Estas células forman filamentos que rodean a los ovocitos vecinos. Las células del folículo tienen vacuolas en su citoplasma. Además, en estas células, se observa un desarrollo importante del retículo endoplásmico. Hay una lámina basal fuera de las células del folículo y, en su cara externa, están situadas las células planas de la teca.

Vitelogénesis (Tamaño: ~380-650 μm) Esta etapa es caracterizada por un aumento sustancial en el tamaño del ovocito, causado por la incorporación de materiales externos dentro del ovoplasma. El ovocito acumula plaquetas que aumentan su tamaño según el desarrollo del ovocito. El corión comienza a engrosarse y se adicionan capas proteicas, teniendo así un arreglo geométrico con la capa más interna. Las microvellosidades cruzan a través de los poros del corión, y se localizan siempre apenas delante de las células de la granulosa. Estas células aumentan su tamaño, convirtiéndose en columnares. Debido al

aumento en el diámetro de los filamentos, en ocasiones parecen estar pseudoestratificados. En esta etapa, algunos desmosomas están incluso presentes entre células de la granulosa. Las células de la teca no cambian su morfología durante la ovogénesis y ellas permanecen como células planas fuera de la lámina basal. Esta última es gruesa, fibrosa y tiene fibras de colágeno orientadas paralelamente a la superficie folicular.

Maduración (Tamaño ~ 650-1150 μm). El ovocito continúa creciendo y el acontecimiento principal de esta etapa es la continuación de la meiosis. Esto comienza con la migración nuclear al polo animal del ovocito. Después de esto, la vesícula germinal se rompe; la proteína de la yema de huevo sufre una desorganización, probablemente debido a la hidrólisis de sus componentes, dando por resultado una masa irregular que ocupa la mayor parte del área central del ovocito. Los lípidos que se acumularon durante la vitelogénesis se ensamblan juntos y forman varias gotas distinguibles del lípido en el hemisferio animal.

En 1998, Uria *et al.*, describe la anatomía, morfología e histología del testículo de *Chirostoma humboldtianum* en diversas etapas de desarrollo gonadal y establece la escala de madurez correspondiente.

1.4.2 Descripción anatómica del testículo de *Chirostoma humboldtianum*

Los testículos de esta especie, como de otros teleósteos, son órganos pares, alargados, compactos; se encuentran localizados en la región dorsal de la cavidad abdominal, conforme se desarrollan cubren el tubo digestivo y llegan a ocupar la mayor parte de la

cavidad abdominal. Anatómicamente son de aspecto lanceolado, contorno irregular, consistencia flexible y suave, en los estadios II y V son de color blanco ligeramente cremoso. Ambos testículos se unen en el extremo posterior y los productos salen por el conducto principal al poro urogenital. Las etapas de madurez gonádica del testículo están divididas en seis estadios.

1.4.3 Características Morfológicas de las células del quiste Testicular.

Espermatogonias. En promedio miden $7\mu\text{m}$, son las células más grandes, tienen citoplasma escaso y acidófilo, presentan un núcleo grande localizado en posición central, cromatina poco condensada y nucleolo prominente. En esta especie las espermatogonias se presentan en todos los estadios de madurez gonádica.

Espermatocitos primarios. Son células de $3.5\mu\text{m}$ en promedio, el núcleo presenta la cromatina de aspecto reticular; el citoplasma es basófilo. Se localiza en quistes a continuación de los que presentan espermatogonias y hasta el tercio medio del túbulo. Los testículos con menor desarrollo gonádico presentan mayor cantidad de espermatocitos primarios. A medida que el desarrollo celular continúa, se forman los espermatocitos secundarios.

Espermatocitos secundarios: son células que miden en promedio $2.8\mu\text{m}$, el núcleo es de forma poliédrica; su cromatina está muy condensada y el citoplasma es acidófilo.

Espermátides: se encuentran quistes localizados hacia el tercio proximal de los túbulos, son células que miden en promedio $2.1\mu\text{m}$, el núcleo redondeado y pequeño está desplazado hacia un extremo de la célula, el citoplasma es acidófilo y escaso.

Espermatozoides: dentro del quiste los espermatozoides forman grupos compactos, en algunos casos se les observa con la cabeza dirigida hacia la parte ciega del túbulo, en otros, las cabezas se orientan hacia el conducto eferente, como si realizaran un giro de 180°. El núcleo del espermatozoide se tiñe intensamente, la cabeza mide en promedio 1.4 µm, la cola es acidófila.

1.4.4 Escala histológica de madurez gonádica del testículo de *Chirostoma humboldtianum*.

Las etapas de madurez gonádica del testículo están divididas en seis estadios; el estadio I consiste en la proliferación espermatogonial o juvenil, aquí las espermatogonias son grandes y con el núcleo y nucléolo conspicuos, las células de Sertoli empiezan a rodear las espermatogonias.

Estadio II, espermatogénesis temprana. Hacia el extremo distal de los túbulos, los quistes presentan espermatogonias, en la parte media se observa a los espermatocitos primarios y secundarios; en la parte proximal se encuentran escasas espermátides y pocos espermatozoides.

Estadio III, espermatogénesis tardía. En la parte distal de los túbulos presentan quistes con espermatogonias, en el tercio medio tienen espermatocitos y en el proximal espermátides y espermatozoides; se incrementa el número de espermatozoides en los conductos.

Estadio IV, madurez funcional o espermatogénesis. En la parte distal de los túbulos presentan algunos quistes con espermatogonias, a continuación algunos quistes contienen

espermaticos y espermátides, pero la mayoría se observa con espermatozoides. Presenta abundantes espermatozoides.

Estadio V. Expulsión. Los quistes escasos, contienen espermatogonias, espermaticos, espermátides y espermatozoides. Los conductos eferentes y principales muy desarrollados se encuentran llenos de espermatozoides.

2. Objetivos

Objetivo general:

Establecer la distribución de PACAP en las gónadas de *Chirostoma humboldtianum*.

Objetivos particulares:

- a) Establecer la distribución de PACAP en el ovario de *Chirostoma humboldtianum*.

- b) Establecer la distribución de PACAP en el testículo de *Chirostoma humboldtianum*.

3. Materiales y Métodos.

Fase de campo

3.1 Obtención del tejido

Las muestras de *Chirostoma humboldtianum* fueron colectadas en la Laguna de Zacapu, Michoacán en los meses de septiembre – noviembre de 2008 y enero – abril de 2009 que fundamentalmente corresponden a las etapas de recrudescencia y madurez respectivamente. El motivo de haber obtenido el material biológico en estos meses es que se presentó una veda de mayo al mes de agosto. Los peces fueron anestesiados con MS-222 Sigma ® y se sacrificaron por decapitación. Las gónadas fueron extraídas y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 2% con ácido pícrico en amortiguador de fosfatos (Stefanini *et al.*, 1967).

Fase de laboratorio

3.2 Procesamiento del tejido.

Los tejidos obtenidos fueron deshidratados en alcoholes a concentraciones crecientes (70%, 80%, 90%, 96% y 100%), las muestras se dejaron 30 min en cada una de dichas concentraciones, en el último porcentaje de alcohol se dejaron durante 45 minutos, una vez deshidratados se colocaron en alcohol amílico por 24 horas. Posteriormente, los tejidos se colocaron parafina 1 y 2 por 2 horas y parafina 3 por 1 hora. Los tejidos fueron incluidos en paraplast.

A continuación se realizaron cortes transversales en un micrótopo rotatorio con un grosor de 7 y 4 micrones para ovario y testículo, respectivamente. Antes de realizar la técnica de inmunohistoquímica se desparafinaron durante 30 minutos a 60°C. Posteriormente se colocaron en xilol I y II por 5 minutos, se hidrató el tejido mediante concentraciones descendentes de alcohol (100%, 96%, 90%, 80% y 70%) a intervalos de 1 minuto. Finalmente, se realizó la técnica de inmunohistoquímica. Que a continuación se describe.

3.3 Inmunohistoquímica.

Una vez hidratado el tejido éste se permeabilizó con metanol a - 20°C, durante 5 minutos. A continuación, se lavó con PBS (0.1M, con un pH de 7.4) y se procedió a inactivar la peroxidasa endógena con etanol ácido durante 30 minutos. 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 (0.1M, pH 7.4) a temperatura ambiente, durante media hora. Una vez bloqueados los sitios inespecíficos se incubó con anticuerpo anti PACAP en una dilución 1: 300 a 4°C en suero bovino 1% en PBS (0.1M, pH 7.4) durante toda la noche. Cumplido el tiempo se lavó con PBS (0.1M, pH 7.4) y se procedió a incubar con el conjugado anti IgG de chivo anti-conejo marcado con peroxidasa en una dilución de 5:1000 durante 2 horas a una temperatura de 4°C. El revelado se realizó con 20mg de DAB en 100ml de PBS con 500ml de peróxido de hidrógeno preparado de la siguiente manera: 33 ml de peróxido de hidrógeno al 30% más 967ml de agua, a un pH de 7.4. La reacción tuvo lugar en un periodo de 2 a 5 minutos. Cuando la reacción fue visible se lavó una vez más con PBS (0.1M, pH 7.4). Después, se contratiñó con Hematoxilina de Mayer y se deshidrató mediante concentraciones crecientes de alcohol (70 al 100%)

durante dos minutos cada uno, posteriormente los tejidos fueron sumergidos en xilol I y II por cinco minutos y se montó con resina sintética Entellan ® Merck. Las laminillas se observaron en un microscopio óptico de marca Nikon.

Controles

Para descartar cualquier falso positivo, se realizaron tres ensayos, y de esta manera observar que la inmunoreacción fuera específica para PACAP. Se realizaron tres controles, el primero se realizó sin inactivar la peroxidasa endógena, agregando el sustrato, el cual tuvo una reacción negativa. El segundo ensayo se realizó inactivando la peroxidasa, agregando el sustrato sin los anticuerpos en la que se observó una reacción negativa. El tercer ensayo se realizó sin bloquear los sitios inespecíficos sin primer anticuerpo (anti PACAP) y con el segundo anticuerpo (anti IgG de chivo anticonejo), diluidos en PBS, en el cual también se observó una reacción negativa, a todos los controles se les siguió con el mismo procedimiento de la técnica inmunohistoquímica (Taylor y Burns., 1974) para observar la reacción que estos presentaban, las muestras se observaron a microscopio.

4. Resultados

En el presente estudio, se observó que PACAP está en el testículo y en el ovario de *Chirostoma humboldtianum*. Los ovarios observados son asincrónicos por lo que fue posible distinguir etapas distintas del desarrollo de los ovocitos. En el ovario las reacciones inmunopositivas fueron localizadas en etapa vitelogénica. Fue posible detectar una reacción inmunopositiva únicamente en células de la granulosa y en células de la teca (Fig. 5) En fases posteriores del desarrollo de los ovocitos (Fig. 6B), no se detecto inmunoreacción, tampoco se pudo observar inmunoreacción en etapas más tempranas de la ovogénesis (Fig. 6A).

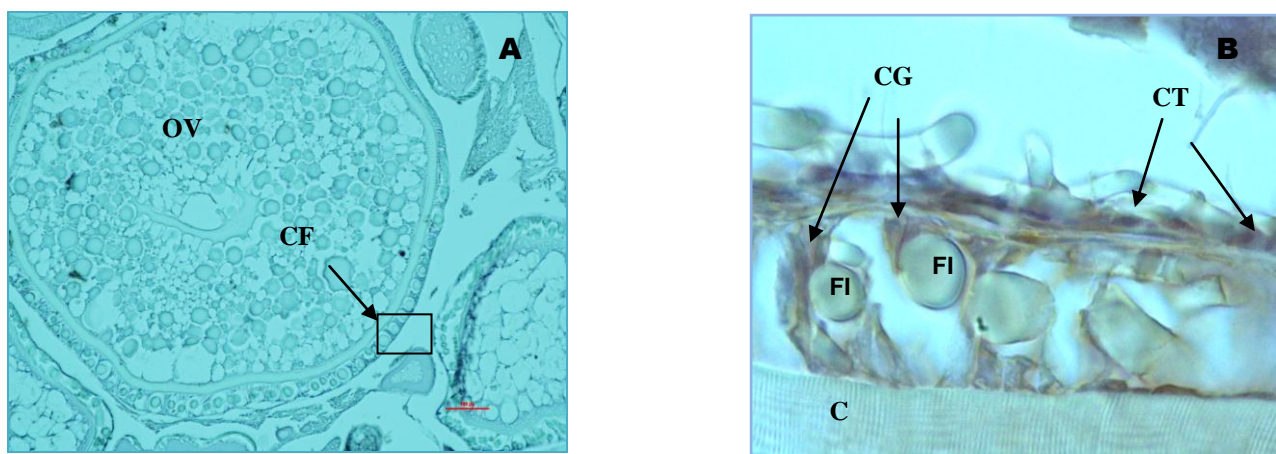


Fig. 5 -Ovario de *Chirostoma humboldtianum*. Secciones transversales donde se muestra: **A**. Ovocito en etapa vitelogénica (OV) 40x, el cual presenta reacción inmunopositiva en las células foliculares (CF). **B**. Aumento 100x de la sección señalada en la fig 5A, donde se observa reacción inmunopositiva en células foliculares; de la teca (CT) y de la granulosa (CG). Filamentos (FI), corión (C).

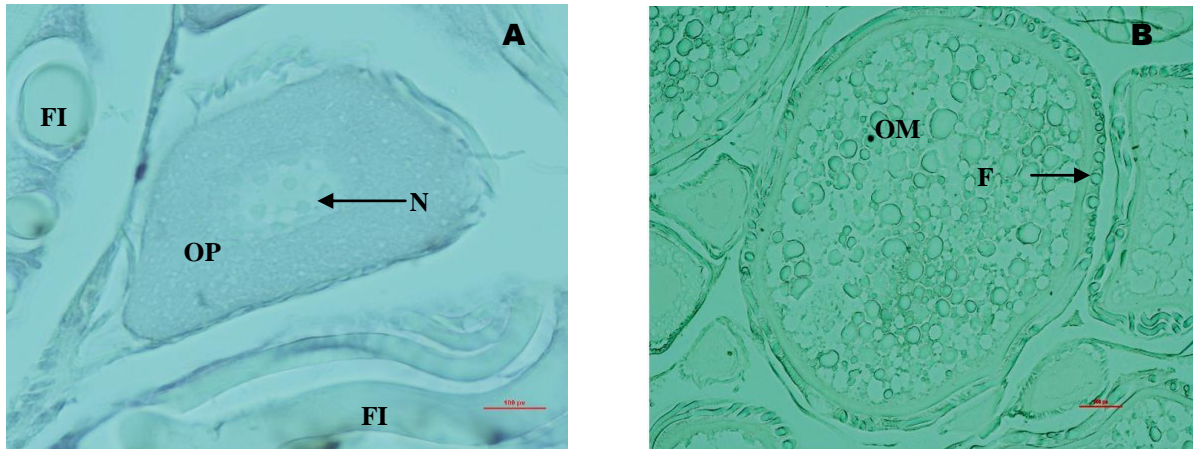


Fig. 6.- Cortes transversales de ovario de *Chirostoma humboldtianum*. **A.** Se muestra un ovocito previtelogénico 40x (OP) el cual no presenta reacción inmunopositiva a PACAP. **B.** Se observa un ovocito maduro 40x (OM) que también muestra inmunoreacción negativa a PACAP. Filamentos (FI), nucléolos (N), folículo (F)

En los testículos se encontró inmunoreacción positiva a PACAP durante las fases iniciales de la gametogénesis, especialmente en espermatogonias y espermatocitos primarios (Fig. 7). No se encontró presencia de este péptido en espermatocitos secundarios, espermátides ni en espermatozoides (Fig 8), tampoco fue evidente la presencia de PACAP en células de Leydig, ni de Sertoli.

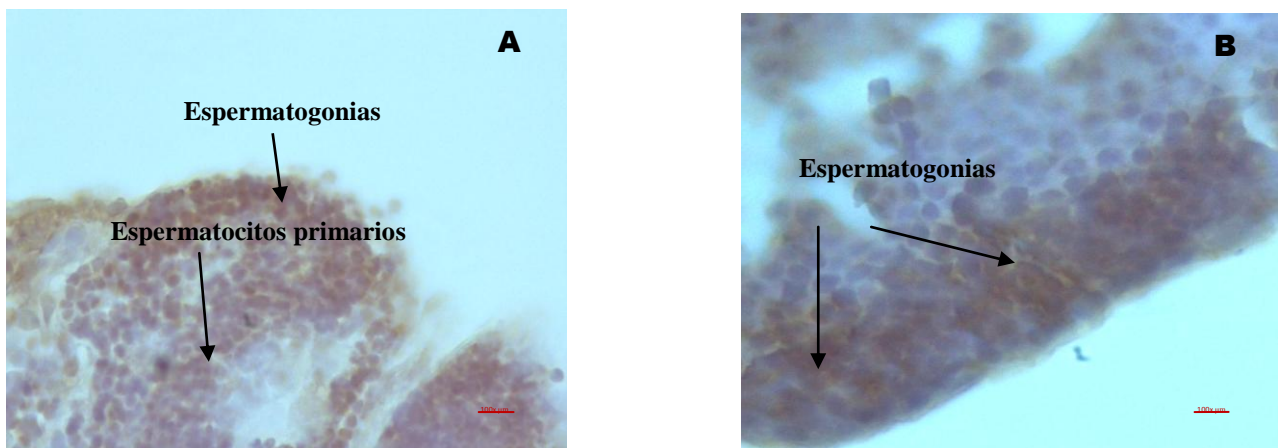


Fig 7.- Cortes transversales de testículo de *Chirostoma humboldtianum*. **A.** Se observa inmunoreacción positiva en espermatogonias y en espermatoocitos primarios 40x. **B.** muestra inmunoreacción positiva en espermatogonias 100x.

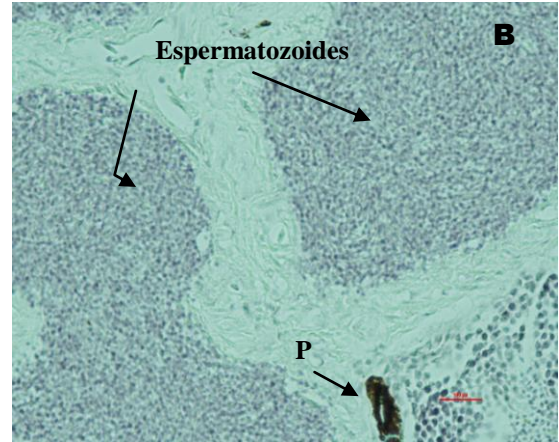
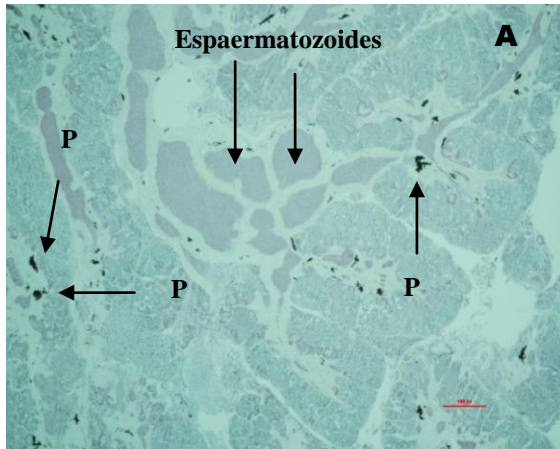


Fig. 8.- Corte transversal de testículo de *Chirostoma humboldtianum* . **A.** Se muestra quistes de espermatozoides los cuales no presentan reacción a PACAP 10x . **B.** Se observa un aumento 40x a de la sección señalada en la Fig 8A la cual exhibe quistes con espermatozoides demostrando reacción negativa a PACAP. Pigmento (P)

Las muestras controles (Fig. 9 y 10), presentaron inmunoreacción negativa, esto indica que las reacciones observadas en los cortes en los que se realizó la técnica inmunohistoquímica, en efecto expresan a PACAP.

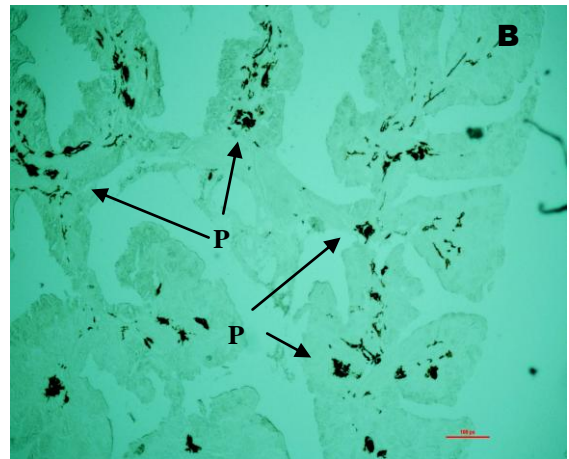
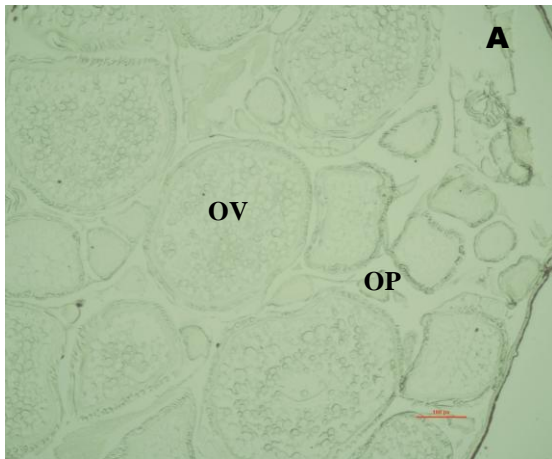


Fig. 9.- Controles realizados 10X de ovario (A) y testículo (B) de *Chirostoma humboldtianum*. Ovario vitelogenico (OV), ovario previtelogenico (OP), pigmento (P).

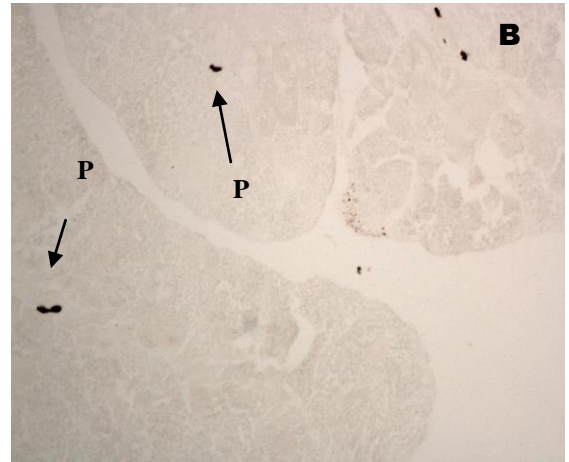
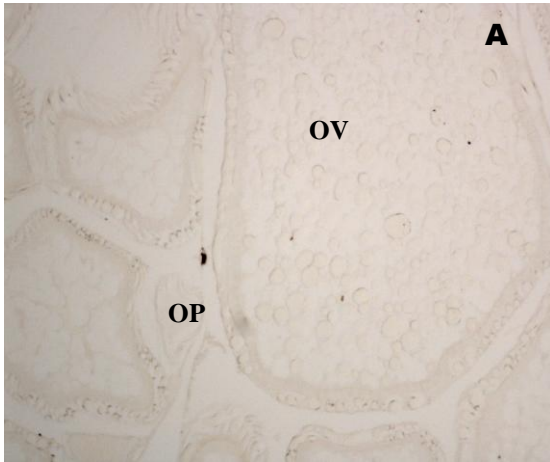


Fig. 10.- Controles realizados 40X para ovario (A) y testículo (B) de *Chirostoma humboldtianum*. Ovario vitelogenico (OV), ovario previtelogenico (OP). Pigmento (P).

		Recrudesencia			Madurez			
		Septiembre	Octubre	Noviembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
Previtelogénesis	Ovocito	-	-	-	-	-	-	-
	Células de la Granulosa	-	-	-	-	-	-	-
	Células de la Teca	-	-	-	-	-	-	-
Vitelogénesis endógena	Ovocito	-	-	-	-	-	-	-
	Células de la Granulosa	+	+	+	+++	++	++	++
	Células de la Teca	+	+	+	+++	++	++	++
Vitelogénesis exógena	Ovocito	-	-	-	-	-	-	-
	Células de la Granulosa	+	+	+	+++	++	++	++
	Células de la Teca	+	+	+	+++	+++	++	++

Tabla 1.- Se presentan los meses en los que se realizaron las colectas de los ovarios de *Chirostoma humboldtianum*, los estadios y las células en las que se observó una reacción positiva a PACAP. +++ Reacción abundante, ++ reacción moderada, + poca reacción.

	Recrudescencia			Madurez			
	Septiembre	Octubre	Noviembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
Espermatogónias	+	+	+	+++	+++	+++	+++
Espermatocitos primarios	+	+	+	+++	+++	++	+++
Espermatocitos secundarios	-	-	-	-	-	-	-
Espermátides	-	-	-	-	-	-	-
Espermatozoides	-	-	-	-	-	-	-
Leydig	-	-	-	-	-	-	-
Sertoli	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 2.- Se presentan los meses en los que se realizaron las colectas de los testículos de *Chirotoma Humboldtianum* y las células en las que se observó una reacción positiva a PACAP. +++ Reacción abundante, ++ reacción moderada, + poca reacción,

5. Discusión

En el presente estudio se reporta la distribución de PACAP en gónadas de *Chirostoma humboldtianum*.

La importancia de la localización de este péptido en las gónadas de dicho pez endémico mexicano, radica principalmente en comprender el papel que desempeña en los acontecimientos reproductivos, apoyándonos en la comparación con diferentes estudios realizados a otras especies de teleósteos y en mamífero, especialmente en rata.

En peces, la expresión de PACAP ha sido detectada en cerebro, hipófisis, médula espinal tracto gastrointestinal, ovario, testículo, hígado, riñón (Wong *et al.*, 2000) y ojo (Frandinge y Sherwood, 2000). Diferentes estudios han promovido una fuerte evidencia de que PACAP actúa como regulador intragonadal en mamíferos; sin embargo, la información en cuanto al papel de este péptido en las gónadas de pez es muy limitada. (Harmar *et al.*, 1998). La presencia de PACAP y de sus receptores en el testículo y en el ovario sugieren que juega un papel importante en el eje hipotálamo- pituitaria- gónada de los vertebrados, para la regulación de las actividades gonadales (Wang *et al.*, 2003, Sherwood *et al.*, 2007). Trabajos realizados con anterioridad han demostrado que PACAP ejerce una regulación local de la actividad de las gónadas masculinas y femeninas en tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Huang *et al.*, 2009), pez cebra (*Danio rerio*) y en rata.

En el presente estudio, la distribución de PACAP en el testículo pudo observarse durante las fases iniciales de la gametogénesis, especialmente en espermatogonias, espermatocitos primarios; y a diferencia de los mamíferos, el péptido no pudo ser localizado en espermátides ni en las células de Leydig, por lo que en *Chirostoma*, la

presencia de PACAP parece encontrarse más vinculada con el desarrollo temprano y la diferenciación del linaje espermático. Se sabe que PACAP estimula la diferenciación y proliferación celular en diferentes tipos celulares, acción ejercida al unirse a su receptor estimulando así la activación de la adenilato ciclasa lo que provoca el incremento intracelular del AMPc a través del receptor PAC1 (Moretti et al 2002). La presencia y distribución de PACAP en las células testiculares inmunorreactivas a dicho péptido antes mencionadas, podría sugerirnos que en *Chirostoma*, PACAP puede contribuir al crecimiento y diferenciación celular y que también podría actuar como un factor trófico durante el desarrollo testicular.

El PACAP es un importante regulador de la esteroidogénesis testicular y estos mismos receptores han sido descritos en células de Leydig. En el presente trabajo no se localizó PACAP en dichas células y ello sugiere que la acción del péptido no es autocrina; sin embargo, dado que no se buscaron receptores PAC1-R en este estudio, no podemos descartar que las células de Leydig no posean dichos receptores y que el PACAP estimule la vía de Adenilato ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (PLC), provocando un aumento en la concentración de AMPc y el consecuente aumento de la producción de testosterona en células de Leydig como sucede en mamífero (Moretti *et al.*, 2002)

En el ovario se observó inmunoreacción positiva en etapas intermedias de la ovogénesis, específicamente, en células de la teca y de la granulosa durante la fase vitelogénica. En ovario, nuestros resultados son similares a los reportados para el péptido en el ovario de mamífero, en cuanto a la presencia y la distribución en las células foliculares, sin embargo la expresión de este péptido en el mamífero puede darse incluso en etapas más tempranas de la foliculogénesis. De igual manera en mamíferos, PACAP se expresa de

forma transitoria en células de la granulosa *in vivo* e *in vitro* y estimula la acumulación de AMPc y la esteroidogénesis de manera dosis-dependiente en cultivos de células de la granulosa (Wang *et al.*, 2003). Hay evidencia de que PACAP también promueve la maduración de los ovocitos tanto en mamíferos como en el pez cebra (Apa *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2003). En el pez cebra, se ha comprobado que PACAP controla la diferenciación y proliferación celular (Mathieu *et al.*, 2004), desafortunadamente, esta fase de la ovogénesis no fue identificada en este trabajo

En el ovario de rata la inducción de las gonadotropinas puede estimular la expresión y secreción de PACAP, sin embargo, su papel durante el proceso ovulatorio aun no esta claramente establecido. (Gras *et al.*, 1999, Koh *et al.*, 1999). Esto sugiere que PACAP puede estar involucrado en la modulación de las funciones ováricas, incluida la esteroidogénesis, maduración de los ovocitos y la supervivencia de las células de la granulosa (Zhong y Kasson 1994, Gras *et al.*, 1999 y Apa *et al.*, 2002). En adición, el PACAP acelera la maduración meiotica en los ovocitos e inhibe la apoptosis en los folículos preovulatorios (Lee *et al.*, 1999 y Vaccari *et al.*, 2006). En el ovario de rata se han identificado los ARNm del PACAP y de su receptor, específicamente en las células de la zona granulosa y lútea. La mayoría de las células de la granulosa de los folículos preovulatorios tiene inmunorreactividad para el PACAP.

Es necesario recalcar que para nuestra especie, a la fecha no se han realizado trabajos en los que se reporte la presencia de este péptido, por lo que es de indispensable importancia continuar con la contribución de conocimientos en cuanto a los procesos reproductivos para de esta manera manguar la desaparición de esta pez endémico mexicano.

6. Conclusión.

El Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria (PACAP) está presente en las gónadas de *Chirostoma humboldtianum*, específicamente, en células de la teca y de la granulosa en el ovario y en espermatogonias y espermatocitos primarios en testículo.

7. Referencias

- ❖ Aguilar J, Navarrete S. 1997. Crecimiento, condición y mortalidad del charal *Chirostoma humboldtianum*. (Atheriniformes; Atherinidae) en México, *Rev. Biol Trop.* 44 (3)/ 45 (1): 573-578.
- ❖ Apa R, lozane A, Mastrandrea M, Miceli F, Macchione E, Fulghesu A, Caruso A, Canipari R. 1997. Effect of Pituitary adenylate cyclase-activating peptide on meiotic maturation in follicle-enclosed, cumulus enclosed, and denuded rat oocytes. *Biol. Reprod.* 57(5):1074-9
- ❖ Apa R, Lanzone A, Miceli F, Vaccari S, Macchione E, Stefanini M, Canipari R. 2002. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates plasminogen activator expression in rat granulosa cell. *Biol. Reprod.* 66(3):830-5.
- ❖ Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy D, Kitada C. 1991. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology.* 129 (5):2787–2789.
- ❖ Barbour C. 1973. The systematic and evolution of genus *Chirostoma svainson* (Pisces: Atherinidae) Tulane. *Stud. Zool. Bot.* 125 (18): 97-141.
- ❖ Cárdenas R, Chávez M, González J, Aley P, Espinosa J, Jiménez-García 2008. Oocyte structure and ultrastructure in the Mexican silverside fish *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniforme: Atherinopsidae). *Rev. Biología tropical.* 56 (3): 1371-1380.
- ❖ Dyer B, S. Chernoff .1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei: Atherinimorpha). *Zool.J.Linn. Soc.* 117 (34):1-69.

- ❖ Figueroa-Lucero G, Meza- González O M, Hernández- Rubio, C Barriga Sosa, D L, A Rodríguez- Canto, A Arredondo- Figueroa. 2004. Growth, survival and mandible development in the larvae of the shortfin silverside *Chirostoma humboldtianum* (Valencinnes) (Atheriniformes: Atherinopsidae) under laboratory conditions. *Aquaculture*.27 (242): 689-696.
- ❖ Fradinger E, Sherwood. 2000. Characterization of the gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GHRH) and Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in zebra fish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 38 (165): 211-219.
- ❖ Gras S, Hannibal J, Fahrenkrug J. 1999 Pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide is an auto/paracrine stimulator of acute progesterone accumulation and subsequent luteinization in cultured periovulatory granulosa/lutein cells. *Endocrinology.* 27 (140): 2199–2205.
- ❖ Hashimoto H, Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Nagata S. 1993. Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuron*.11 (2): 333–342.
- ❖ Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP. 1998 International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev.* 50 (2): 265–270.
- ❖ Huang T, Li C, Wu J, Chang S, Lee L, Weng F.2009. Expression and *in vitro* regulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP 38) and its type I receptor (pac1-r) in the gonads of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Reprod.Fer*.137 (3):349-364.

- ❖ Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S. 1992. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron*. 8 (4): 811–819.
- ❖ Koh P, Kwak S, Kang S, Cho G, Chun S, Kwon H, Choi W. 2000. Expression of Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP type I A receptor mRNAs in granulosa cells of preovulatory follicles of the rat ovary. *Mol Reprod. Dev.* 55 (4): 379-386.
- ❖ Krempels K, Usdin B, Harta G, Meze E. 1995. PACAP acts through VIP type 2 receptors in the rat testis. *Neuropeptides*. 8 (29): 215- 320.
- ❖ Lee J, Park HJ, Choi HS, Kwon HB, Arimura A, Lee BJ, Choi WS, Chun SY 1999. Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of PACAP as a follicle survival factor. *Endocrinology*. 140 (2): 818–826.
- ❖ Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, Harmar AJ. 1993. The VIP2 receptor, molecular characterization of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Letters*. 334 (7): 3–8.
- ❖ Mathieu M, Ciarlo M, Trucco N, Griffiero F, Damonte G, Salis A, Vallarino M. 2004. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the brain, spinal cord and sensory organs of the zebrafish, *Danio rerio*, during development. *Develop. Brain Res.* 151(1-2):169-85.
- ❖ Miyata A, Arimura A, Dhal R, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler M. D, and Coy D.1989. Isolation of a novel 38 residue hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 (8): 567-574.

- ❖ Moretti C, Menacacci C, Frajese C, Cerelli M, Frajese G. 2002. Growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the reproductive system. *TEM*. 13 (10):428-35.
- ❖ Ok K, Dong K, Soo K, Jae C, Chum S, Bang K, Sung C. 2000. Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP type I A receptor mRNAs in granulosa cells of preovulatory follicles of the rat ovary. *Moll Reprod Dev*.55 (4): 379-386.
- ❖ Paulo-Maya J Figueroa L, Soria- Barreto M.2000. Peces dulcacuicolas mexicanas XIX *Chirostmoa humboltianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae) *ANCBI-IPN.Zool. Inf.* 43 (2):59-74.
- ❖ Philip B, Daniel Joel F, and Habener.2000.Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Gene Expression Regulated by a Testis-Specific Promoter in Germ Cells during Spermatogenesis. *Endocrinology*.141 (3): 1218-27.
- ❖ Ramírez S, Millar P, Curra C, León O .2004. El polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) actualización de conocimientos. *Salud mental*.27 (2): 1-55.
- ❖ Rojas CP, Sasso LF. 2005. El pescado blanco. *Rev. Dig. Univ.* 6(8): 2-18.
- ❖ Scaldaferrri L, Aurora K, Lee S, Catt K, Mretti C.1996. Expression of PACAP and its type-1 receptor isoforms in the rat ovary. *Endocrinology*. 117(2):227-32.
- ❖ Shioda S, Legrardi G, Leung W, Nakajo S, Nakaja K, Arimura A. 1994. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid in the rat testis by, light and electron microscopic immunocytochemistry and in situ hybridization. *Endocrinology*.135 (3):818-825.

- ❖ Sherwood M N, Krueckl, L and McRoy,E. 2000.The origin and Function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/ Glucagon Superfamily.*Endocrine. Rev.* 9 (6): 619-70.
- ❖ Stefanini *et al.*, 1967.Buffer formaldehyde with picrate.29-30. In Histological and Histochemical methods. Ed.by Kiernan, J. A. Pergamon press. New York.(1990).
- ❖ Taylor, Burns.1974.Localization of immunoglobulins in paraffin sections of formaldehyde fixed tissues. In Techniques in clinical immunology.Ed.by Thompson R.A.Blackwell scientific publication Oxford.
- ❖ Uria E, Moncayo E, Garibay R. 1998. Desarrollo y madurez testicular del charal *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinidae) del embalse Huapango, Edo de México. *Hidrobiológica.* 8 (001): 9-18.
- ❖ Vaccari S, Latini S, Barbieri M, Stefanini M. 2006. Characterization and expression of different pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat ovarian follicles. *J.Endocrinol.* 191 (1): 287-299.
- ❖ Vaudry D, González BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors, from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52 (2): 269–324.
- ❖ Wang Y, Wong A, Ge W. 2003. Cloning, Regulation of Messenger Ribonucleic Acid Expression, and Function of a New Isoform of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in the Zebrafish Ovary. *Endocrinology.* 144 (11): 4799-4810.
- ❖ Wong A, Li W, Lee E, Leung M, Tse L, Chow B. 2000. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide as a novel hypophysiotropic factor in fish. *Biochem. Cell Biol.* 78 (3): 329-343.

- ❖ Zhong Y, Kasson BG.1994. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates steroidogenesis and adenosine 30,50-monophosphate accumulation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 135 (5): 207–213.

Apéndice 1

Amortiguador de formaldehído con picrato.

(Stefanini *et al.*, 1967).

Paraformaldehído.....20g

Acido Pítrico (Solución acuosa saturada, filtrada).....150ml

Calentar a 60°C, añadir de 2 a 5 gotas de hidróxido de sodio acuoso 1.0M (4%), necesario para disolver el paraformaldehído. Filtrar, enfriar y llevar a 1000ml 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_3HPO_4).....17.89g

Llevar a 1000ml.

Nota: el pH es de 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 las que se improvisa la preservación de la estructura y de la antigenicidad no se conocen.