



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y  
CLONACIÓN DE *pjGnRH* EN EL CHARAL  
(*Chirostoma humboldtianum*)**

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGEXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**BIOL. MACEDO GARZÓN BEATRIZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS**

**COMITÉ TUTOR: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS  
DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR**



MÉXICO, D.F.

MAYO, 2012



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y  
CLONACIÓN DE *pjGnRH* EN EL CHARAL  
(*Chirostoma humboldtianum*)**

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**BIOL. MACEDO GARZÓN BEATRIZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS**

**COMITÉ TUTOR: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS  
DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR**



MÉXICO, D.F.

MAYO, 2012



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de enero de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **MACEDO GARZÓN BEATRÍZ** con número de cuenta 98092266 con la tesis titulada "AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y CLONACIÓN DE pGnRH EN EL CHARAL (*Chirostoma humboldtianum*).", realizada bajo la dirección del (la) **DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS**:

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Vocal: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR  
Secretario: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS  
Suplente: DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES  
Suplente: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de abril 2012.

*M. del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM, por aceptarme y permitirme continuar con mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por haberme distinguido y otorgarme una beca para poder terminar mis estudios. No. de Beca 225423.

Al proyecto PAPIIT IN216910, por los recursos destinados para la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras y al Dr. Carlos Gerardo García Tovar, por ser miembros del Comité Tutor.

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL:**

Al Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas, por darme de nuevo la oportunidad y aceptarme para realizar este trabajo, por todo el apoyo brindado, la confianza, comentarios y sugerencias, además de sus conocimientos aportados a lo largo de todo este tiempo.

Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras, por las sugerencias, ayuda con los alineamientos a lo largo de este trabajo de tesis.

Al Dr. Carlos Gerardo García Tovar por las revisiones, aportes y sugerencias, para el mejoramiento de la presente.

A la Dra. María Elena Ayala Escobar. Por su tiempo y sus valiosas aportaciones y recomendaciones, en el mejoramiento de este escrito.

A los Doctores Sergio Vaca Pacheco y Erasmo Negrete Abascal, por el préstamo de equipo y consejos para la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, gracias por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda, por darme el tiempo necesario para poder culminar con la tesis.

Al Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, por la revisión de este trabajo.

## **DEDICATORIA:**

A las personas que investigan y hacen posible que la endocrinología de la reproducción en el mundo de los peces sea mejor entendida.

A mis padres Ricardo y Sonia Luz y mis hermanos Elvira y Rodrigo por estar al pendiente de la culminación de esta etapa de mi vida.

A mis compañeros y amigos que han estado este tiempo en el laboratorio y han amenizado, dado consejos y ayuda, Mónica, Ale, Luz, Anahí, Rosaura, Edgar, Marisol y Humberto.

A Alfredo, Gyovana, Osvaldo y Melisa, que durante estos años me han dado muchos ánimos y consejos para que este trabajo de tesis haya salido adelante.

A Efraín, por tenerme paciencia, darme su tiempo, apoyo y amor. Sobre todo, por estar conmigo en las buenas y en las malas, no tengo palabras para expresarle mi agradecimiento, porque eso ya lo sabe.

A Rodolfo, Misael, Sergio, Angy, Aide, Yair, Itzel, Julio, Ismael, Sandra y Antonio, por ofrecerme momentos muy agradables y todas sus ocurrencias dentro y fuera de la Facultad.

A mis compadres, Nayo y Dario por estar al pendiente del término de este trabajo y brindarme su amistad.

A Andrea, Tatiana, Memo, Maite, Nicolás, Juan, Julio, Tomás, Valeria, Daniela, Rita y Thálita, gracias a ellos aprendí que se necesita de mucho valor y paciencia para el estudio de la fisiología de los peces ya que es un área tan interesante pero también tan compleja que se requiere ser muy perseverante.

A todas las personas que han estado en este tiempo y que no se necesita de un reconocimiento en papel para saber que han aportado y han sido parte de mi vida, gracias.

## **INDICE:**

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 GnRH (Hormona Liberadora de las gonadotropinas)	5
1.2 Isoformas de la GnRH	7
1.3 Procesamiento de la GnRH	12
1.4 Distribución de la GnRH	14
1.5 Receptores y señales de transducción a la GnRH	16
1.6 Regulación de la síntesis y liberación de la GnRH	22
Enfocado a los miembros de la familia RFamida (GnIH y Kisspeptina).	
1.6.1 GnIH (Hormona Inhibidora de las gonadotropinas)	24
1.6.2 Kisspeptina	25
2. Antecedentes	27
3. Consideraciones de la especie en estudio	28
4. Planteamiento del problema	32
5. Objetivos	33
6. Materiales y Métodos	34
7. Resultados	40
8. Discusión	49
9. Conclusiones	62
10. Perspectivas	63
11. Referencias	64



## RESUMEN

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido que estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas (GtH's) en la hipófisis. La estructura del propeptido de GnRH está conformada por un péptido señal (PS), la secuencia de la GnRH, el sitio de procesamiento (Gly-Lys-Arg) y la secuencia del péptido asociado a la GnRH (GAP). *Chirostoma humboldtianum*, es un pez teleosteo, perteneciente a la familia Atherinidae, que se conoce comúnmente como charal grande o pez blanco. Esta especie se puede encontrar en los lagos y corrientes dulceacuícolas del altiplano manifestando un marcado endemismo del territorio mexicano. En otros atherínidos, se ha reportado en el encéfalo, la presencia de tres isorformas, pjGnRH, cGnRH-II y sGnRH, por lo que se asume que el *Chirostoma humboldtianum* las posee también. El objetivo del presente trabajo fue aislar, secuenciar y clonar pjGnRH en el charal (*Chirostoma humboldtianum*). Se colectaron organismos de ambos sexos, de la laguna de Zacapu Michoacán. Se extrajo el RNA con la técnica basada en el Método de Extracción Guanidil-tiocianato-fenol-cloroformo (Chomczynski & Sacchi, 1987). Se realizó RT-PCR para la obtención de cDNA y posteriormente se realizó PCR (los oligonucleotidos usados, fueron basados según el Guilgur *et al.*, 2007). Se obtuvieron productos de diferentes pesos moleculares (200, 300 y 400pb), que en conjunto corresponden a la parte del decapeptido de la isoforma pjGnRH, sitio de corte y el péptido asociado a la GnRH (GAP), esta secuencia parcial tiene similitud del 87% con la isoforma pjGnRH de *Odonthestes bonariensis*, tanto para nucleótidos como para aminoácidos. Además, se ha encontrado en el cerebro, la presencia del intrón B, cuando es removida dicha secuencia, tiene mayor similitud con otras secuencias de GnRH. La retención de intrones, en especial del Intrón A, se ha reportado en el cerebro de ratones y en las gónadas de algunas especies de peces, como *Oncorhynchus mykiss*, *Anguilla japonica* y *Sparus aurata*. Su función aun no es muy clara, pero se sugiere que puede actuar como regulador transcripcional. Aun falta obtener la secuencia del Péptido señal, además que estudios posteriores puedan confirmar la localización de dicha isoforma para así poder establecer su participación en la liberación de las gonadotropinas.

## ABSTRACT

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is a decapeptide that stimulates the synthesis and release of gonadotropins (GtH's) in the pituitary. The structure of the GnRH peptide is comprised of a signal peptide (SP), the sequence of GnRH, the processing site (Gly-Lys-Arg) and the sequence of GnRH-associated peptide (GAP). *Chirostoma humboldtianum*, is a teleost fish belonging to the family Atherinidae, which is commonly known as charal or white fish. This species can be found in freshwater lakes and streams of the plateau demonstrating a marked endemism of Mexican territory. In other atherinids, has been reported in the brain, the presence of three isorforms, pjGnRH, cGnRH-II and sGnRH, so it is assumed that the *Chirostoma humboldtianum* also possesses. The aim of this study was to isolate sequence and clone pjGnRH in charal (*Chirostoma humboldtianum*). Organisms were collected from both sexes, of Lake Zacapu Michoacan. RNA was extracted using the technique based on the Extraction Method guanidyl-thiocyanate-phenol-chloroform (Chomczynski & Sacchi, 1987). RT-PCR was performed to obtain cDNA and subsequent PCR was performed (the oligonucleotides used were based according Guilgur *et al.*, 2007). The obtained products of different molecular weights (200, 300 and 400pb), which together correspond to the part of decapeptide pjGnRH isoform, cleavage site and the GnRH-associated peptide (GAP), this sequence has partial similarity of 87 % with pjGnRH isoform of *Odonthestes bonariensis*, both nucleotides to amino acids. Furthermore, it has been found in the brain, the presence of the intron B, when said sequence is removed, has a greater similarity to other sequences of GnRH. The retention of introns, especially in the Intron A has been reported in the brains of mice and in gonads of some fish species such as *Oncorhynchus mykiss*, *Anguilla japonica* and *Sparus aurata*. Its function is not yet clear, but suggests that it may act as a transcriptional regulator. Even failure to obtain the signal peptide sequence, in addition to further studies to confirm the localization of this isoform in order to establish his involvement in the release of gonadotropins.

## 1. INTRODUCCIÓN:

Los peces óseos constituyen el grupo más abundante de los vertebrados, al menos se han descrito 27,977 especies de peces para todo el planeta (Nelson, 2006). Dichos organismos habitan principalmente en aguas dulces, salobres y marinas. Su importancia radica en que son considerados como una muy buena fuente de alimento (Osornio, 2001), además algunas especies son importantes para la pesca deportiva, de ornato, especies exóticas, nativas o endémicas de cada país o región. Es por eso que ante la demanda, se han tenido que desarrollar diversas técnicas para poder mantener en cautiverio, crecer y reproducir varias especies que tienen importancia comercial y de ornato, cuya finalidad es la obtención de un mejor tamaño, mayor producción y supervivencia tanto de las crías, como de los adultos.

En los vertebrados, el eje reproductivo está conformado por tres niveles de organización: el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas, conocido como el eje H-H-G, dentro de él, son activados muchos de los procesos celulares y moleculares que participan conjuntamente, para dar paso a los ciclos reproductivos, activando un gran número de eventos muy complejos (Amano *et al.*, 2002). Este recibe una serie de informaciones dadas por diversas condiciones fisiológicas y ambientales teniendo diferentes respuestas dependiendo de la especie (Fernández-Fernández *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2005).

Al dar inicio los ciclos reproductivos, el hipotálamo tiene que integrar la información proveniente de factores ambientales, como es la temperatura, el fotoperiodo, la osmolaridad en el agua, el alimento, las feromonas. También las condiciones reproductivas en las que se encuentre el organismo por ejemplo su propio ciclo reproductivo, el sexo (gonocóricos o hermafroditas), disponibilidad de hembras y machos y edad del individuo entre otros (Dickey & Swanson, 2000; Gur *et al.*, 2000; Melamed *et al.*, 2000; Zohar *et al.*, 2010). Estos factores actuarán en conjunto para estimular por medio de diversas señales a las neuronas localizadas principalmente en el hipotálamo, en donde la Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es sintetizada y liberada dando paso a una serie de rutas de señalización (Onuma *et al.*, 2005).

GnRH, es la principal señal para estimular e inducir en la hipófisis la liberación pulsátil de las gonadotropinas, Hormona luteinizante (LH) y la Hormona folículo estimulante (FSH).

En los tetrápodos, la GnRH es transportada por el sistema portahipofisiario, mientras que en los teleósteos la entrega es por vía directa a través de las terminaciones axonales.

Ambas gonadotropinas están conformadas por dos subunidades distintas, una  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales están unidas entre sí de manera no covalente. La subunidad  $\alpha$ , es la más conservada en su secuencia, para ambas gonadotropinas y la fracción  $\beta$ , muestra menos homología (Counis *et al.*, 2005). Estas son liberadas al torrente sanguíneo y transportadas hacia las gónadas donde se unen a sus receptores específicos para la LH en las células de Leydig, en el testículo así como en las células de la teca en el folículo ovárico para la FSH en las células de Sertoli y en las células de la granulosa, respectivamente), estas conducen a diferentes acciones, en las hembras la LH, estimula fundamentalmente la ovogénesis, ovulación y formación de cuerpo lúteo, así como la síntesis de progesterona y estradiol, en los machos, a la espermiación y secreción de andrógenos; mientras que la FSH en hembras, induce el crecimiento y maduración de los folículos ováricos y en machos, la espermatogénesis (Enomoto *et al.*, 2004; Kaiser *et al.*, 1997; Millar, 2005).

Este eje ha sido determinado en varias especies de peces, esto con la finalidad de saber su fisiología durante gran parte de su ciclo de vida y su relación con otros neuropéptidos para poder establecer diferentes estrategias que promuevan el crecimiento y la reproducción teniendo como consecuencia el mantenimiento y la sobrevivencia a futuro de la especie de interés.

## 1.1. GnRH (Hormona liberadora de las gonadotropinas)

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

El primer dato sobre la GnRH, es que fue encontrada en el tejido hipotalámico de mamíferos placentarios placentados (cerdos y ovejas). A esta isoforma se le nombró mGnRH (Amoss, *et al.*, 1971). Se ha reportado que se encuentra en el encéfalo de ratas, hámsters, perros y algunas especies de ranas (Gautron, 1991; Montaner, 2001b).

Las GnRHs, es una familia de decapeptidos (excepto la isoformas para no-cordados), su principal función es estimular la síntesis y liberación de las gonadotropinas (GtH's) en la hipófisis, además, en el encéfalo y otros tejidos puede funcionar como neuromodulador/neurotransmisor.

En el ciclido *Astatotilapia burtoni* se ha encontrado que el incremento de esta hormona, influye en el comportamiento reproductivo y fenotipo de machos dominantes, dando paso al incremento de gonadotropinas, testosterona y gónadas, permitiendo, la reproducción (Burmeister *et al.*, 2005; Hofmann, 2006, Maruska *et al.*, 2011).

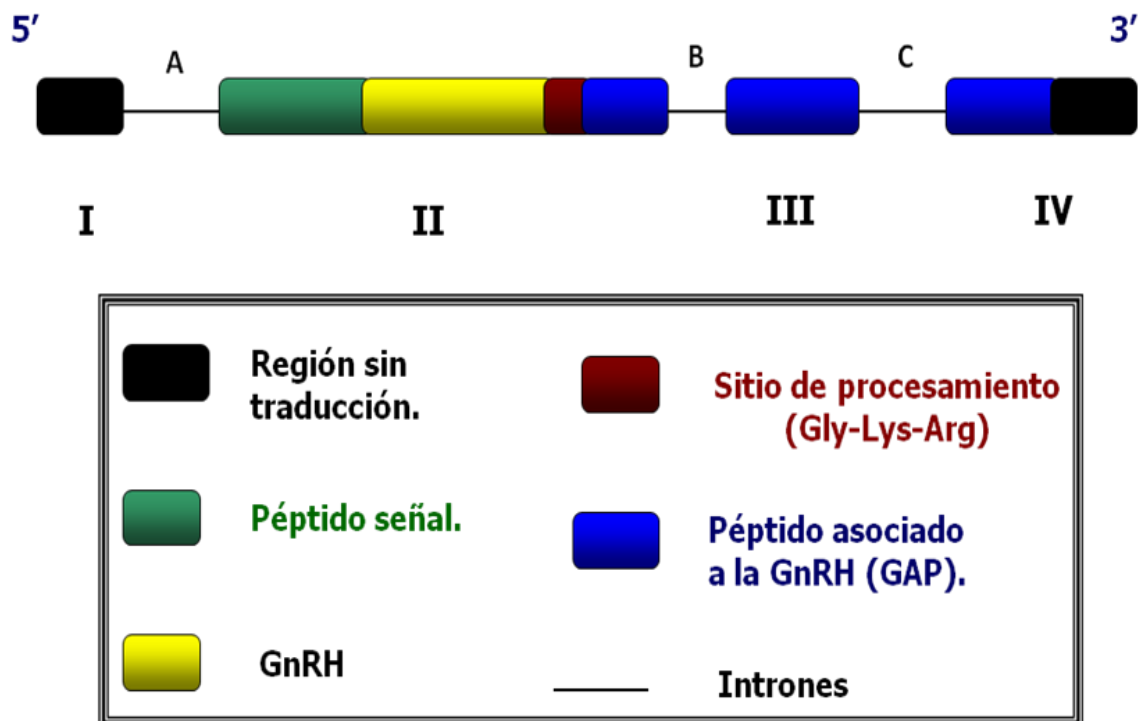
También se ha detectado la presencia de ARN mensajero de esta hormona, así como su receptor, en otros órganos como son las gónadas (Uzbekova, *et al.*, 2001).

En cuanto al aspecto molecular, todos los genes que codifican para las distintas isoformas de la GnRH en todos los vertebrados, consisten de 4 exones separados por 3 intrones.

El primer exón codifica para el extremo 5' sin traducción (5-UTR). En el segundo, se encuentra el péptido señal (PS), la secuencia de la GnRH, el sitio de procesamiento (Gly-Lys-Arg) y una parte de la secuencia del péptido asociado a la GnRH (GAP). El exón 3, contiene la parte media de la secuencia del GAP. En el cuarto exón, se encuentra la última

parte del GAP y la región del extremo 3' sin traducción (3-UTR). Para cada intrón, se posee un sitio de corte, el cual se caracteriza por tener dos pares de bases GT (donador) y una AG (aceptor) (Kitahashi *et al.*, 2004) (Figura 1).

El gen de la GnRH, es un excelente ejemplo de la regulación que se requiere para mantener la función de un gen evolutivamente conservado Debido a la capacidad reproductiva es fundamental para la supervivencia de la especie, la homeostasis fisiológica que dicta las condiciones óptimas para el éxito reproductivo, y cualquier perturbación de este equilibrio puede afectar la expresión de GnRH, tanto el gen como su regulación, requiere de diversas señales, así como de neuromoduladores (Belsham & Lovejoy, 2005).



**Figura 1.** Se ilustra la organización general del gen de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) en vertebrados. Los cuadros indican los exones, los cuales están numerados y las líneas, los intrones, marcados con letras. (Modificado de Okubo y Nagahama, 2008).

## 1.2. Isoformas de la GnRH

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

En los últimos años se tienen descritas 28 isoformas de GnRHs, en el cerebro o estructuras equivalentes (Tsai, 2006; Adams, 2002). En los vertebrados, cordados inferiores e invertebrados el número de isoformas puede variar, 14 están presentes en los vertebrados, dentro de estas 8 están en los teleósteos, 9 en tunicados y 6 en invertebrados. Dichas isoformas son tradicionalmente nombradas según la especie de la cual se aislaron (Stefano *et al.*, 2000; Amano *et al.*, 2002; Zmora, 2002; Guilgur *et al.*, 2007; Lethimonier *et al.*, 2004).

La secuencia de aminoácidos para GnRH es similar entre los cDNAs obtenidos a partir de las diversas especies de teleósteos, teniendo regiones conservadas en las posiciones 1, 4, 9 y 10 principalmente (Tabla 1) (Okubo, *et al.*, 2000; Somoza *et al.*, 2002).

**Tabla 1.** Se muestra la estructura primaria de las secuencias de aminoácidos de las 28 isoformas de GnRH reportadas en vertebrados e invertebrados.

GnRH	1			2	3	4	5	6	7	8	9	10	Referencias
<b>Vertebrados</b>													
mGnRH	p-Glu			His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH <sub>2</sub>	Baba, <i>et al.</i> , 1971.
sbGnRH	-			-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	Powell, <i>et al.</i> , 1994.
pjGnRH	-			-	-	-	Phe	-	-	Ser	-	-	Montaner, <i>et al.</i> , 2001;
mdGnRH													Somoza, <i>et al.</i> , 2002.
sGnRH	-			-	-	-	-	-	Trp	Leu	-	-	Sherwood, <i>et al.</i> , 1983.
wfGnRH	-			-	-	-	-	-	Met	Asn	-	-	Adams, <i>et al.</i> , 2002.
cfGnRH	-			-	-	-	His	-	-	Pro	-	-	Bogerd, <i>et al.</i> , 1994.
hrGnRH	-			-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	Carosfeld, <i>et al.</i> , 2000.
dfGnRH	-			-	-	-	-	-	Trp	Leu	-	-	Lovejoy, <i>et al.</i>



														<i>al.</i> , 1992.
cGnRH-II	-			-	-	-	-	-	-	Tyr	-	-		Miyamoto, <i>et al.</i> , 1984.
cGnRH-I	-			-	-	-	-	-	-	Gln	-	-		King, <i>et al.</i> , 1982.
rGnRH	-			-	-	-	-	-	-	Trp	-	-		Yoo, <i>et al.</i> , 2000.
gpGnRH	-			Tyr	-	-	-	-	Val	-	-	-		Jiménez, <i>et al.</i> , 1997.
lGnRH-I	-			-	Tyr	-	Leu	Glu	Trp	Lys	-	-		Sower, <i>et al.</i> , 1993.
lGnRH-III	-			-	-	-	His	Asp	-	-	-	-		Sower, <i>et al.</i> , 1993.
<b>Cordados</b>														
tGnRH- I	-			-	-	-	Asp	Tyr	Phe	Lys	-	-		Powell, <i>et al.</i> , 1996.
tGnRH- II	-			-	-	-	Leu	Cys	His	Ala	-	-		Powell, <i>et al.</i> , 1996.
tGnRH- III	-			-	-	-	-	Glu	Phe	Met	-	-		Anctil, 2001.
tGnRH- IV	-			-	-	-	Asn	Gln	-	Thr	-	-		Adams, <i>et al.</i> , 2003.

tGnRH- V	-			-	-	-	-	Glu	Tyr	Met	-	-	Adams, <i>et al.</i> , 2003.
tGnRH- VI	-			-	-	-	Lys	-	-	Ser	-	-	Adams, <i>et al.</i> , 2003.
tGnRH-VII	-			-	-	-	-	Ala	-	-	-	-	Adams, <i>et al.</i> , 2003.
tGnRH-VIII	-			-	-	-	Leu	-	-	-	-	-	Adams, <i>et al.</i> , 2003.
<b>Invertebrados</b>													
apGnRH	-	Asp	Tyr	His	Phe	Ser	Asp	Gly	Trp	Tyr	Ala	Gly	Zhang, <i>et al.</i> , 2000.
olGnRH	-	His	-	-	-	-	-	-	-	Lis	Ser	-	GeneBank N° acceso FC805608
anGnRH	-	Ala	-	-	-	-	His	-	-	Phe	Pro	-	GeneBank N° acceso EY629959
ocGnRH	-	Asp	-	-	-	-	Asp	-	-	His	Pro	-	Iwakoshi, <i>et al.</i> , 2002.
* <i>Strongylocentrus purpuratus</i> -GnRH	-	Val	His	-	Arg	Phe	Ser	Gly	-	Arg	-	-	Tomado de Roch <i>et al.</i> , 2011).

* <i>Helobdela robusta</i> -GnRH	-	Ser	Iso	-	Phe	Ser	Arg	Ser	-	Glu	-	-	Tomado de Roch <i>et al.</i> , 2011).
----------------------------------	---	-----	-----	---	-----	-----	-----	-----	---	-----	---	---	---------------------------------------

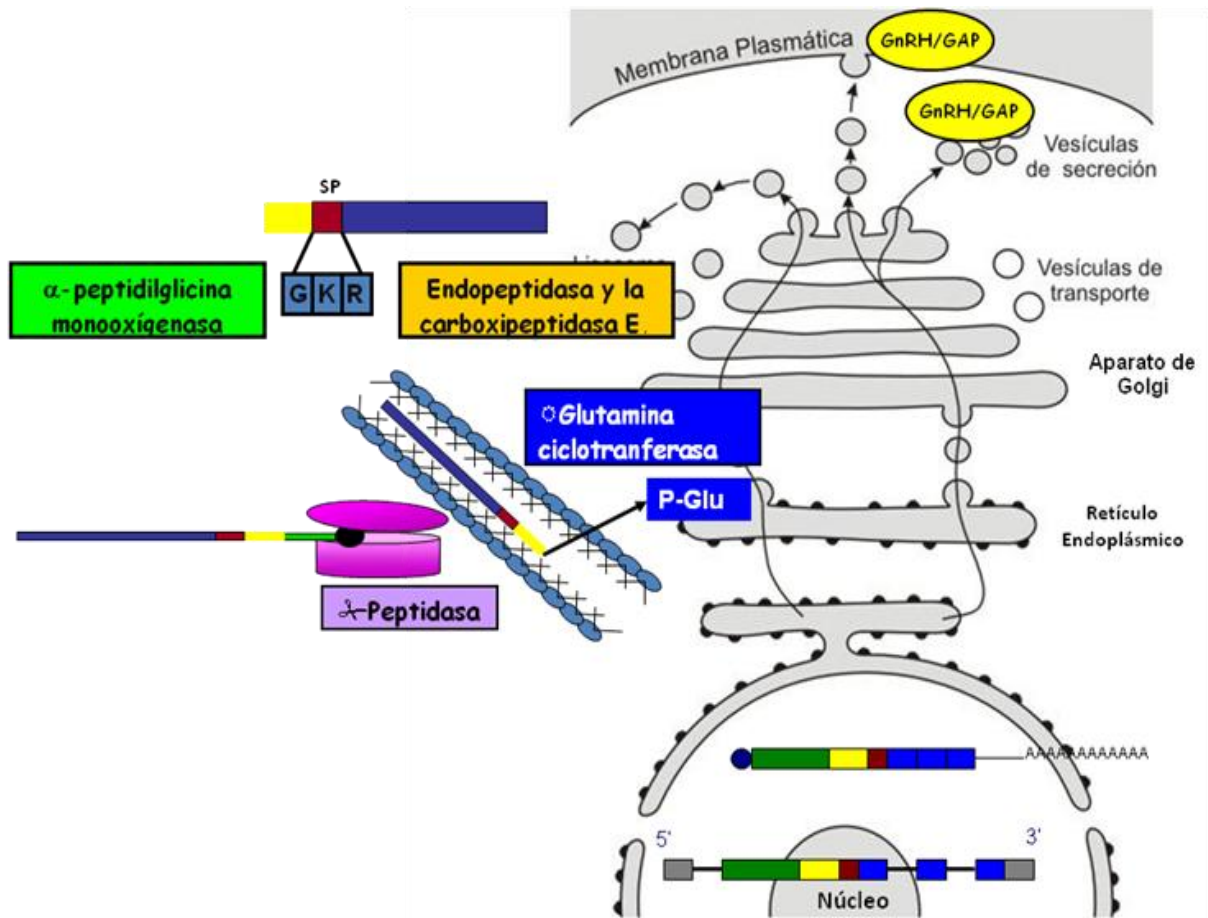
GnRH de mamífero (mGnRH), de pollo I (cGnRH- I), GnRH de rana (rGnRH), GnRH de lúmina (sbGnRH), GnRH de pez blanco (wfGnRH), GnRH de bagre (cfGnRH), GnRH de arenque (hrGnRH), GnRH de medaka (mdGnRH) o GnRH de pejerrey (pjGnRH), GnRH de pez perro (dfGnRH), GnRH de pollo II (cGnRH-II), GnRH del conejillo de indias (pgGnRH), GnRH de lamprea I y I I I (IGnRH), GnRH de tunicado I -VI I I (tGnRH), GnRH de *Aplysia* (apGnRH), GnRH de *Lottia Gigantean* (olGnRH), GnRH de anélido (anGnR) y GnRH de pulpo (oGnRH), \**Strongylocentrus purpuratus*-GnRH y *Helobdela robusta*-GnRH. (Modificada de Lethimonier, *et al.*, 2004; Okubo *et al.*, 2000; Roch *et al.*, 2011; Somoza *et al.*, 2002; Tsai & Zhang, 2008).

### 1.3. Procesamiento de la GnRH

Para que se lleve a cabo el procesamiento del precursor de la GnRH, es la eliminación del péptido señal, a través de una peptidasa, esta parte de la molécula posee como característica particular que sus residuos de aminoácidos la mayoría son hidrofóbicos, tras la ruptura, el residuo de ácido glutámico del extremo amino terminal de esta hormona se cicla para producir ácido piroglutámico (P-Glu) por una glutamina ciclotransferasa, una vez acontecido este evento, es transportado al Aparato de Golgi. Este péptido, está acoplado al sitio de procesamiento y al GAP, el primero compuesto por una glicina dadora de amida y los residuos de Lisina y Arginina, que son escindidos mediante la acción de dos enzimas, una endopéptidasa y una carboxipeptidasa  $\epsilon$ , permitiendo que se separe el GAP y considerándose que este decapeptido ya está maduro.

El grupo carboxilo terminal de dicho péptido está conformado por la unión de los residuos Glicina-Glicina, en las posiciones 10 y 11, estos sufren una modificación gracias a la  $\alpha$ -peptidil-glicina monooxigenasa, que amida el grupo carboxilo terminal en la posición 10 del péptido ya activo. A continuación, la GnRH junto con el GAP son almacenados en gránulos de secreción y es transportado a las terminales axonales para su posterior liberación (Rangaraju *et al.*, 1991; Wetsel *et al.*, 1991, Zohar *et al.*, 2010) (Figura 2).

Se considera que el GAP inhibe la secreción de la prolactina (Nikolics *et al.*, 1985) y estimula la liberación de las gonadotropinas (Millar *et al.*, 1986). También se ha considerado, que el GAP sólo se limita como péptido de apoyo y que proporciona la estructura secundaria adecuada para el procesamiento correcto de la prepro-GnRH (Millar, 2008).



**Figura 2.** Esquema que indica el procesamiento del precursor de la GnRH, desde el núcleo celular, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, hasta la secreción de vesículas. Con la participación de diversas enzimas: la peptidasa, glutamina ciclotransferasa,  $\alpha$  peptidilglicina monooxigenasa, endopeptidasa y la carboxipeptidasa  $\epsilon$ .

## 1.4. Distribución de la GnRH

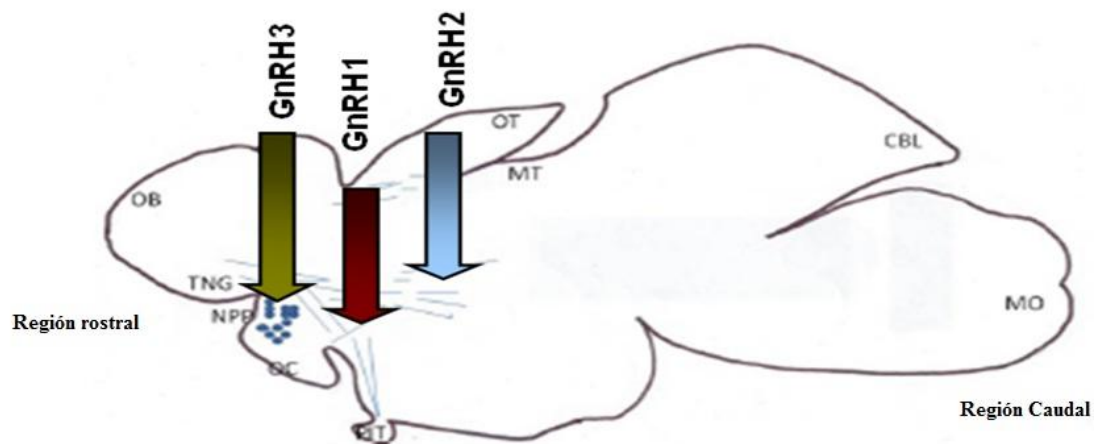
Con base en diversos análisis bioinformáticos, utilizando el método de agrupamiento Neighbour-Joining, así como algunos análisis filogenéticos, Fernald y White (1999), se ha propuesto una nomenclatura, en donde se puedan identificar los genes y los péptidos para la GnRH.

Tanto en humanos, como en el resto de los mamíferos, el gen que codifica para la conocida mGnRH, se le denominará GnRH1. El segundo gen, que se encuentra presente en todos los vertebrados y que codifica para la isoforma más conservada, conocida comúnmente como la cGnRH-II, se le designará como GnRH2, para los mamíferos y *Gnrh2*, en los no mamíferos.

En el caso de que existiera un gen que codifique para una tercera isoforma, el cual se ha encontrado en muchas especies de teleósteos, pero aún no ha sido localizada en mamíferos, llamada sGnRH, se le nombrará como GnRH3.

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

Debido a la existencia de presencia de 3 isoformas reportada para varias especies de teleósteos, se ha establecido que existe relación entre la distribución y la función de esta neurohormona en el encéfalo, designado como GnRH1 como la forma específica de cada especie, que se distribuye principalmente en el área preóptica (APO) e hipotálamo, promoviendo la liberación de las gonadotropinas. La GnRH2 es una isoforma altamente conservada en los vertebrados y su secuencia es la que se denominó cGnRH-II, su ubicación es en el mesencéfalo y se le atribuye una función neuromoduladora. En teleósteos, se cuenta con reportes de una tercera variante, llamada GnRH3 y hasta la fecha la secuencia de aminoácidos corresponde a la de la sGnRH y está presente en el ganglio del nervio terminal (GNT) (Guilgur *et al.*, 2006, 2007) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de un corte sagital del cerebro del charal (*Chirostoma humboldtianum*), en donde se muestra con flechas de distinto color, la distribución de los tres sistemas de GnRH. Abreviaciones: BO (Bulbo olfativo), TNG (Nervio del ganglio terminal), NPP (Núcleo paraventricular), OC (Quiasma óptico), PIT (Hipófisis), OT (Tectum óptico), MT (Cerebro medio), CBL (cerebelo), MO (Medula oblongada) (Tomado y modificado de Chávez, 2009).

Sin embargo, el trabajo de González-Martínez et al., (2001), describieron en el *Dicentrarchus labrax*, la existencia de sobreposición en la distribución de dos de sus isoformas anteriormente descritas, sGnRH y sbGnRH (GnRH3 y GnRH1, respectivamente), ambas variantes se expresan en las células del bulbo olfatorio hacia la región del área preóptica. Pero este no es el único caso, también existen reportes en otras especies de teleósteos como, el pez blanco (*Coregonus cupeaformis*) (Vickers et al., 2004), la corvina blanca (*Micropogonias undulatus*) (Mohamed et al., 2005), *Cichlasoma dimerus* (Pandolfi et al., 2005), y la corvina (*Argyrosomus regius*) Teniendo resultados similares (Confente et al., 2005).

## 1.5. Receptores y señales de transducción a la GnRH.

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

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

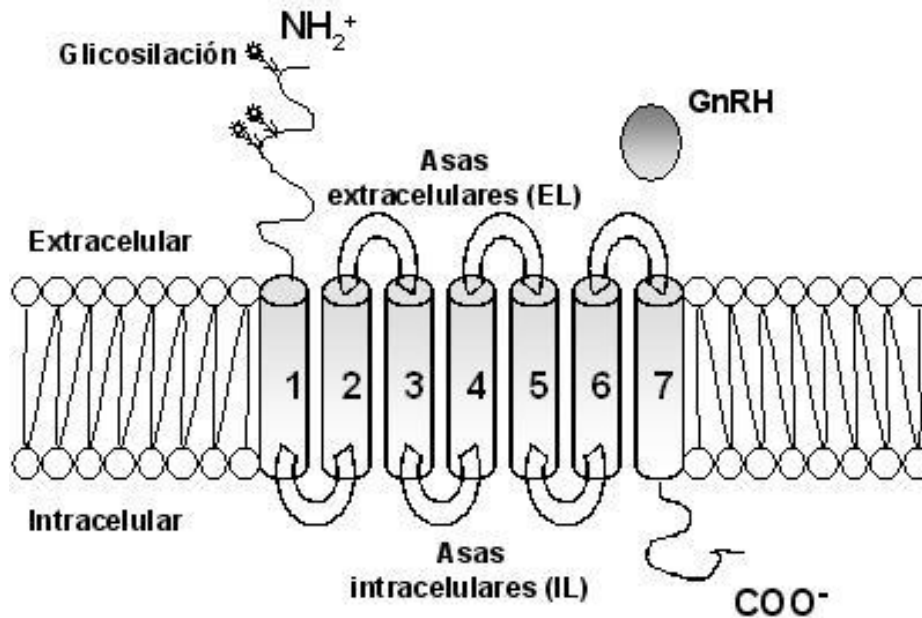
A mediados de 1980, se sugirió que el receptor de la GnRH, estaba ligado con el mecanismo de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). En 1992, con la clonación del cDNA para receptores en varias especies y la deducción de secuencias de aminoácidos, confirmarían que el receptor de la GnRH, posee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

Dentro de los GPCR, los GnRH-Rs son miembros de la gran superfamilia de la rodopsina. Estos receptores, cuentan con tres dominios funcionales: un amino terminal extracelular con una cantidad de 30-40 residuos de aminoácidos y algunos de ellos pueden estar glicosilados; 7 dominios transmembranales (TMs) con hélices  $\alpha$  (280-290 aminoácidos), la cual es característica de esta superfamilia. Sin embargo, en mamíferos, la diferencia es la ausencia del carboxilo terminal del tallo citoplasmático, el cual es el encargado de la desensibilización o el reciclaje de los receptores e internalización de los GPCRs. Los TMs estan unidos por 3 asas extracelulares (EL) y 3 asas intracelulares (IL), importantes para la unión del ligando y señales de transducción, respectivamente, y el Carboxilo terminal citoplasmático que puede estar palmitolado. Su función es mediar los efectos de unión, propagación de señales, la desensibilización o el reciclaje, provocada por la exposición prolongada a la GnRH o sus agonistas e internalización del receptor (Lehhimonier, *et al.*, 2004; McArdle, *et al.*, 2002; Millar *et al.*, 2004; Moncaut, *et al.*, 2005; Pawson & McNeilly, 2005) (Figura 4).



En muchos GPCRs, la región del tallo citoplasmático, se ha visto que juega un papel determinante en la regulación de las señales del receptor, la desensibilización y el tráfico intracelular (Ferguson, 2001). El asa intracelular y el tallo del carboxilo terminal, han sido incluidos en el acoplamiento de los GPCRs a las proteínas G.

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



**Figura 4.** Estructura general del Receptor a la GnRH. En donde se muestra el extremo amino extracelular, los 7 dominios transmembranales (TMs), conectados por 3 asas intra y extracelulares (IL y EL, respectivamente) y un extremo carboxilo intracelular. Además de los sitios de glicosilación.

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

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

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

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

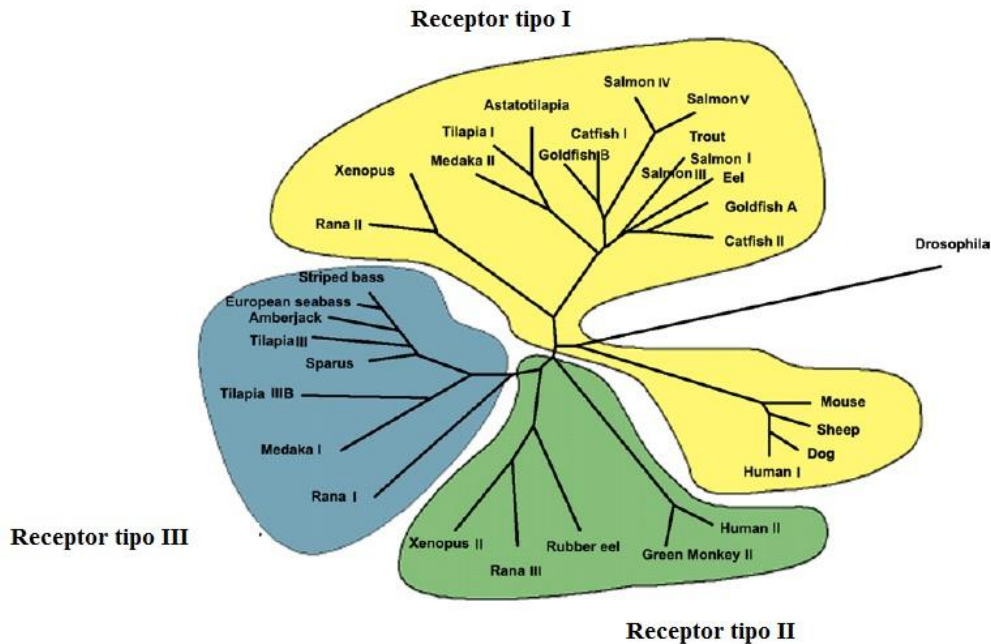
Se han encontrado tres diferentes receptores en especies como: *Oryzias latipes* (Okubo, *et al.*, 2003; Okubo, *et al.*, 2001), *Oreochromis niloticus* (Soga, *et al.*, 2005); dos en: *Danio rerio* (Troskie, *et al.*, 1998), *Carassius auratus* (Illing, 1999), *Clarias gariepinus* (Bogerd, *et al.*,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

En el pejerrey (*Odontheistes bonariensis*), se ha reportado la presencia de dos receptores para las distintas isoformas de GnRH, llamados pjGnRHR-I y II, respectivamente. Guilgur *et al.*, (2008), reportaron que para las hembras de esta especie, el receptor II, se expresa en la hipófisis, particularmente durante el estado de desarrollo folicular, llegando a la

conclusión de que este receptor es responsable de la estimulación directa de la síntesis y liberación de las gonadotropinas. Esto también ha sido probado en otras especies de peces que demuestran las variaciones de expresión de los GnRHRs durante el proceso de maduración gonadal (Habibi & Peter 1991; Alok *et al.*, 2000; González- Martínez *et al.*, 2004).

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

Los receptores del tipo I y II, muestran un agrupamiento muy extenso. El hecho de que, los receptores del tipo I se encuentren en todas las clases de vertebrados, indica que este receptor es antiguo, y se postula que pudo ser el primero, para luego poder separarse. Los receptores del tipo III, solo incluyen a los peces, en especial, a los perciformes y algunas especies de anfibios, por lo que se puede sugerir que la evolución a lo largo del linaje de los teleósteos, ha sido completamente aislada de otras clases de vertebrados. Comparando las secuencias del III, están más relacionados con las del tipo II, que con las del tipo I, postulándose que la relación entre los tipos II y III de receptores surgieron de la duplicación de un gen antiguo en los vertebrados inferiores (Levavi-Sivan *et al.*, 2006; Levavi-Sivan & Avitan, 2005; Millar, 2004) (Figura 5).



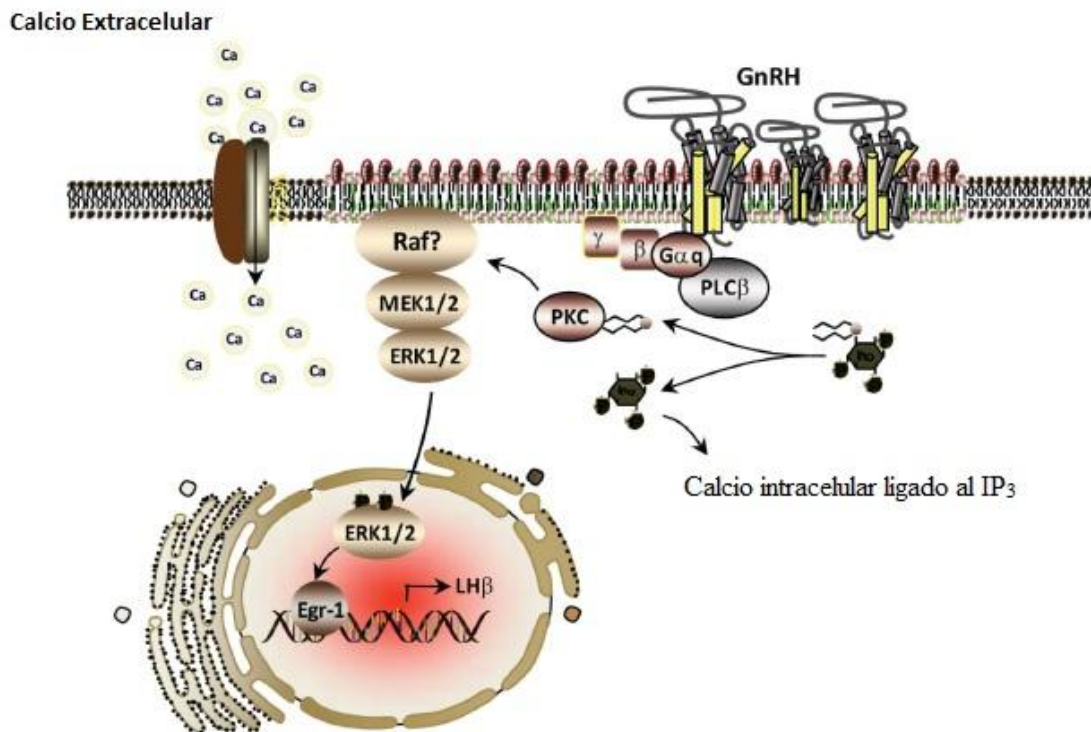
**Figura 5.** Árbol filogenético en donde se muestran los tres tipos de receptores para la GnRH, en el receptor de tipo I se agrupan principalmente todos los vertebrados, en el receptor II se agrupan algunos anfibios, peces y mamíferos, en el receptor III solamente teleosteos (Tomado de Levavi-Sivan, *et al.*, 2005).

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

La GnRH, se une a sus receptores en la membrana celular de las células gonadotropas de la hipófisis dando una interacción que provoca un cambio conformacional en el receptor promoviendo la activación de los segundos mensajeros (Abe, *et al.*, 2002; Grosse, *et al.*, 2000).

Una vez dada la interacción ligando-receptor las proteínas G, se activa la Fosfolipasa C (isoforma  $\beta$ ), y cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) a inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub>, moviliza el Calcio intracelular, el cual activa a la Proteínacina C (PKC), en especial a las isoformas PKC $\beta$  y PKC $\beta$ -II, las cuales se encuentran en las gonadotropas (Kraus, *et al.*, 2001; Junoy, *et al.*, 2002). La fase inicial

del incremento del calcio intracelular aumenta el funcionamiento del receptores al  $IP_3$ , en los almacenamientos intracelulares, mientras que en la fase de meseta, depende de la entrada del calcio extracelular, el cual se encuentra principalmente, vía canales de voltaje del tipo L, estimulando la síntesis y liberación de la LH y FSH, en donde se expresan las tres subunidades para estas (la subunidad  $\alpha$ , LH $\beta$  y FSH $\beta$ ) (Timpmark *et al.*, 2005; Counis *et al.*, 2005; Burger *et al.*, 2004; Ando *et al.*, 2001) (Figura 6).



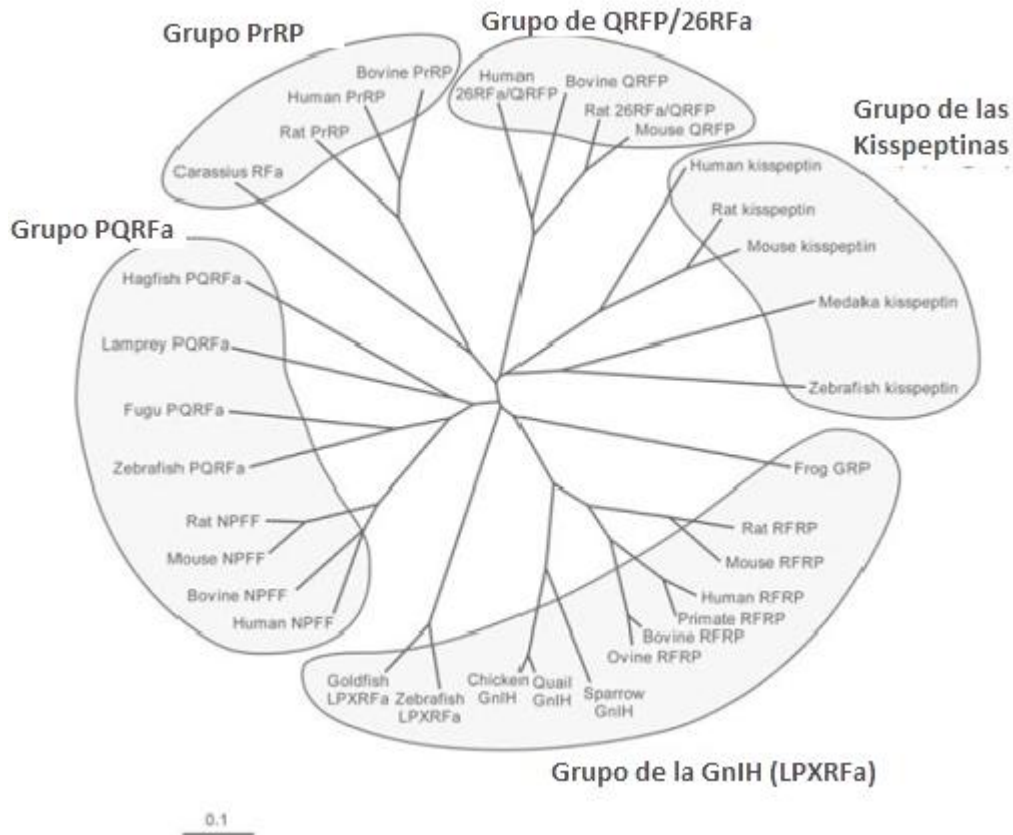
**Figura 6.** Modelo de las señales de transducción del receptor a GnRH en las células gonadótropas. Raf, MEK y ERK (cascada de las MAP quinasas), PKC (proteína quinasas C), PLC (Fosfolipasa C), IP $_3$  (Inositol tri-fosfato) y Egr-1 (Proteína de respuesta al crecimiento temprano) (Tomado de Bliss *et al.*, 2010).

## **1.6. Regulación de la síntesis y liberación de la GnRH: Enfocado a miembros de la familia RFamida (GnIH y Kisspeptina)**

En vertebrados, la pubertad se define como el proceso en que un animal sexualmente inmaduro adquiere por primera vez, la capacidad para reproducirse (Okuzawa, 2002). En los peces, esta etapa inicia con el desarrollo de las gónadas, presentándose la primera espermatogénesis y la ovogénesis en el caso de machos y hembras, respectivamente (Schulz & Miura, 2002).

Una variedad de péptidos que contienen en su secuencia el dominio RFamida han sido identificados en varios vertebrados.

En vertebrados, se han clasificado cinco grupos de esta familia: 1. El grupo de péptidos LPXRFamida, que incluyen a la Hormona inhibidora de las gonadotropinas (GnIH) y a los péptidos relacionados con RFamida (RFRP); 2. El grupo de de los péptidos PQRFamida, que incluyen al neuropéptido FF (NPFF); 3. El grupo del péptido liberador de la prolactina (PrRP); 4. El grupo de las kisspeptinas/metastinas; y el grupo de péptidos RFamida glutamylado (QRFP) y 5. El grupo de la 26RFamida (Tsutsui, K, 2009, 2010) (Figura 7).



**Figura 7.** Se muestra un árbol filogenético de la familia de péptidos RFamida. Los datos obtenidos indican la presencia de 5 grupos: (1) PQRFamida, (2) Péptido Liberador de la Prolactina (PrRP), (3) GnIH, (4) Kisspeptinas, (5) Péptido RFamida pirolglutaminado (QRFP) (Tomado de Tsutsui, 2009).

El descubrimiento reciente de neuropéptidos que participan dentro del eje reproductivo y que regulan a GnRH como es el caso de Kisspeptina y de GnIH ha cambiado la forma de entender el eje reproductivo en los vertebrados en los pasados 10 años.

### 1.6.1. GnIH (Hormona inhibidora de las gonadotropinas)

En el año 2000, Tsutsui y colaboradores, aislaron en la codorniz japonesa con la técnica de HPLC un dodecapéptido hipotalámico cuya función es opuesta a la de GnRH, llamándola hormona inhibidora de las gonadotropinas (GnIH) (Tsutsui *et al.*, 2000).

Esta hormona se ha amplificado y localizado en varias especies de aves, además se han identificado genes ortólogos (copias divergentes de un mismo gen con la misma función), en otros vertebrados, encontrándose en algunas especies de peces y humanos. En general, la GnIH y sus genes ortólogos actúan de manera similar regulando el proceso de reproducción.

Esta hormona ha sido mejor caracterizada en aves, en donde con la técnica de RACE se sabe que el precursor consta de 173 residuos de aminoácidos que codifican para dos péptidos relacionados con la GnIH (GnIH-RP-1 y GnIH-RP-2).

Con la técnica de Inmunohistoquímica, se ha localizando la distribución de la GnIH en las aves, ratones y peces, ubicándose en el núcleo paraventricular (PVN), el hipotálamo y presenta proyecciones axonales muy cercanas a las neuronas del área preóptica (APO) que secretan GnRH (Bentley *et al.*, 2003; Osugi *et al.*, 2004; Ubuka *et al.*, 2008; Ukena *et al.*, 2003).

En peces, se han reportado diferentes efectos en la liberación de las gonadotropinas. En el pez dorado (*Carassius auratus*), se han encontrado tres isoformas de la GnIH denominadas LPXRFa 1, 2 y 3, respectivamente, todas ellas provocan incremento en la secreción de LH, FSH y hormona de crecimiento (GH). En cultivos hipofisarios de *Oncorhynchus nerka*, además tampoco existe un efecto en la liberación de prolactina y somatolactina (Amano, *et al.*, 2006). Sin embargo, en el pez cebra (*Danio rerio*), se observa la disminución en la secreción de LH (Zhang *et al.*, 2010).



## 1.6.2. Kisspeptina

Hace algunos años, se ha encontrado la existencia de una nueva vía de regulación positiva al eje reproductivo, el sistema de las kisspeptinas y de su receptor (GPR54) (Lovane *et al.*, 2004; Seminara, 2005, 2006; Tena-Sempere, 2006). La kisspeptina 10, es una hormona producida en el hipotálamo y es codificada por el gen KiSS-1, perteneciendo a los miembros de la familia de RFamida (Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) (Lee *et al.*, 2009).

El sistema KiSS-1/GPR54 fue estudiado inicialmente por su capacidad para inhibir la progresión de ciertos tumores. Investigadores del Colegio Estatal de Medicina en Hershey (Pennsylvania, USA), descubrieron el gen conocido como Kiss1 (Lee *et al.*, 1996).

El gen Kiss1 codifica varios péptidos llamados kisspeptinas capaces de suprimir la metástasis en determinados tipos de tumores mediante la activación de su receptor específico: el GPR54. El producto del gen Kiss1 es una proteína precursora de 145 aminoácidos que por procesamiento proteolítico genera la metastina, de 54 aminoácidos, y otros péptidos de menor tamaño (14, 13 o 10) que forman la familia de las kisspeptinas (Ohtaki *et al.*, 2001; Kotani *et al.*, 2001).

En el control de la función reproductora, las kisspeptinas actúan principalmente en el hipotálamo estimulando la liberación de la GnRH (Messenger *et al.*, 2005b; Castellano *et al.*, 2005). Este efecto muy probablemente es directamente sobre las neuronas GnRH, ya que expresan el gen GPR54 (Irwig *et al.*, 2004). La expresión de KiSS1/GPR54 está regulado indirectamente por la LH y la FSH. En experimentos con ratones gonadectomizados, existe aumento significativo en la expresión de las gonadotropinas (Navarro *et al.*, 2005a). Estos resultados fueron confirmados y ampliados mediante hibridación *in situ* mostrando un incremento del mRNA para KiSS1 en el núcleo arcuato de ratones de ambos sexos tras la gonadectomía, revertido por el tratamiento con testosterona y estradiol, respectivamente (Smith *et al.*, 2005a; Smith *et al.*, 2005b). Estos resultados no descartan una posible acción complementaria de las kisspeptinas hipotalámicas en el control de la secreción de gonadotropinas directamente. El GPR54 se

expresa también en la hipófisis, pero los resultados acerca de esta posible acción moduladora son contradictorios, ya que se ha descrito un efecto estimulador (Navarro *et al.*, 2005a.; Navarro *et al.*, 2005b) así como la ausencia de efectos (Matsui *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004). Un importante conjunto de datos experimentales evidencian que la activación peripuberal del sistema KiSS1/GPR54, es un proceso altamente regulado y tiene funciones esenciales en el comienzo de la pubertad en vertebrados (Shahab *et al.*, 2005; Matsui *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2004b).

En el ratón, existen dos regiones blanco para la Kisspeptina, el primero, se encuentra en el APO, cercana a las neuronas que secretan la GnRH, y el segundo, cerca de la eminencia media con proyecciones axonales en la hipófisis anterior. Por medio de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, también se han identificado en el núcleo periventricular anteroventral (AVPV) y el núcleo Arcuato. Se sabe que la distribución en estas áreas son similares en ambos sexos, en hembras el número de cuerpos celulares detectados en el AVPV es más alto para el caso de las ratas y los ratones (Mikkelsen & Simonneaux, 2008).

El ligando para kisspeptina es un receptor acoplado a la proteína G llamado GPR54, y se ha visto que si este sistema presenta algún tipo de mutación, puede presentar diferentes fenotipos como una pubertad retrasada o adelantada. En humanos y ratones, si es inactivado el receptor GPR54, se presenta hipogonadismo (de Roux *et al.*, 2003).

Dicho receptor pertenece a los receptores acoplados a la proteína G. La característica esencial, es que la vía de señalización dada por este receptor, permite la secreción de la GnRH. (Castaño *et al.*, 2009). En peces han demostrado que los niveles de expresión de GPR54, aumentan de manera significativa durante el inicio de la pubertad (Aerle *et al.*, 2007).

## 2. ANTECEDENTES

El pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), es un Aterínido nativo de la provincia de Buenos Aires, Argentina teniendo importancia comercial y en la pesca deportiva.

En el 2003, Guilgur *et al.*, obtuvieron por el método de RACE (Rápida amplificación de los extremos del cDNA), las secuencias de las 3 isoformas de la GnRH pjGnRH, cGnRH-II y sGnRH (GnRH-I, GnRH-II y GnRH-III, respectivamente). Los análisis de estas secuencias completas muestran que tienen diferentes pesos moleculares, 441, 530 y 516pb.

En hembras maduras de pejerrey, el mRNA de la pjGnRH es significativamente más alto con respecto a las hembras que se encuentran en etapa recrudesciente o en reposo. Existiendo una correlación positiva con el crecimiento gonadal, reforzando la idea que es importante como regulador de la actividad reproductiva en esta especie (Guilgur, 2009).

Además con base en análisis filogenéticos se ha determinado que esta isoforma se encuentra en el mismo clado de las isoformas denominadas hipofisiotrópicas, denominadas GnRH-I estimulando directamente la síntesis y liberación de las gonadotropinas (Guilgur, *et al.*, 2007, 2009).

### 3. CONSIDERACIONES DE LA ESPECIE EN ESTUDIO:

México es uno de los países más ricos en cuanto al número de especies animales, para el caso de peces, cuenta con 375 especies dulceacuícolas de las cuales el 60 % son nativas, lo cual ubica a nuestro país como uno de los más importantes en riqueza ictiofaunística, esto es debido a su gran variedad de especies (Miller, 1986).

De los peces nativos mexicanos, destacan los charales los cuales pertenecen al género *Chirostoma* y han sido consumidos desde la época prehispánica, estos peces junto con otras especies conformaban la ictiofauna del centro de México (Fernández *et al.*, 2008).

*Chirostoma humboldtianum*, pertenece a la familia Atherinidae, conocido comúnmente como charal (nombre derivado del tarasco *charae*) o pez blanco del Altiplano, que es el nombre que se le aplica a las especies que alcanzan tallas mayores a los 20 cm, siendo una de las más importante dentro del grupo de los charales (Rojas 2005).

Filogenéticamente *Chirostoma humboldtianum*, ha sido considerado como el posible ancestro que dio origen a las especies de mayores dimensiones en cuanto al género, conocidos coloquialmente como peces blancos, además de ser la primera especie íctica del género teniendo su origen y distribución en México. Por otro lado, es endémica del Valle de Toluca y una de las especies primitivas, según sus características en cuanto a pigmentación y dentición (Martínez *et al.*, 2006).

Dentro del género, se puede encontrar en los lagos y corrientes dulceacuícolas del altiplano manifestando un marcado endemismo del territorio mexicano y su distribución está restringida a la Meseta Central en México (González, 2002). Actualmente se encuentra distribuido en la Laguna de Zacapu y Lago de Pátzcuaro en Michoacán, el río Lerma, Trinidad Fabela, Huapango y Tiacaque entre otras lagunas en el Estado de México, lagos de Santa María y San Pedro Lagunillas en Nayarit y lago Juanacatlán en Jalisco (Paulo-Maya *et al.*, 2000). Además, en los años setenta, se realizaron translocaciones en cuerpos de agua de los estados de Chihuahua, Puebla, Tamaulipas, Hidalgo, Querétaro, Guanajuato y el Estado de México (Rosas, 1976) y Michoacán, por lo que su distribución se ha ampliado de manera artificial. Esta especie juega un papel muy importante en la alimentación de los

habitantes en las localidades en donde se encuentra distribuido, ya que este es comercializado de diversas formas; fresco, seco, en forma de boquerón, tamal entre otros (Navarrete, 1981; Borrego, 2001) (Figura 8). Estos gozan de una gran aceptación en la dieta del pueblo mexicano, sostienen importantes pesquerías y en algunos casos es factible su cultivo.

Actualmente, existen cinco especies de peces blancos, *Chirostoma lucius*, *Ch. sphyraena*, *Ch. promelas*, *Ch. estor* y *Ch. humboldtianum*. Estos peces llegan a alcanzar tallas más de 30cm y un peso por arriba de los 300 gramos.



**Figura 8.** Fotografía donde se muestran organismos de pez blanco (*Chirostoma humboldtianum*), colectados de la laguna de Zacapu Michoacán.

El crecimiento de esta especie es relativamente lento, alcanzando su primera madurez al primer año de vida, cuando alcanza una talla de aproximadamente de 13 cm. Se sabe que no presentan dimorfismo sexual ya que no se presentan características morfológicas como lo es el color, tamaño, que permitan diferenciar entre machos y hembras. La proporción sexual para la reproducción es de tres a cuatro machos por hembra (Blancas *et al.*, 2003; Mares y Morales, 2003). Se considera multípara de tipo asincrónica, presentando varios desoves la mayor parte del año, que puede ir desde Diciembre hasta Septiembre (Villacaña, 1999).

La producción del pez blanco ha ido disminuyendo considerablemente (Navarrete & Cházaro 1992), de tal manera que resulta de gran relevancia el conocimiento sobre la alimentación, reproducción y crecimiento del género, en particular de esta especie ya que es considerado el pez blanco más grande, llegando a alcanzar hasta los 30.5 cm de longitud total (Barbour, 1973). Los pocos estudios hechos a esta especie, solo se han enfocado a su variación morfológica (De la Cruz & Moncayo, 1985), histología gonádica (Garibay *et al.*, 1988) y alimentación (Téllez, 1979; Gámez, 1984; Navarrete & Cházaro, 1992).

La situación de los miembros del género *Chirostoma*, es delicada, ya que, de las 23 especies todavía validas para el género, cuatro se encuentran dentro de la NOM-059-Ecol-1994 y el decremento de la abundancia, al menos otras cuatro especies de *Chirostoma*, se podrían considerar como preocupantes (Barriga-Sosa, 2001).

En México, son escasos 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 (Maya *et al.*, 2000).

Sin embargo, recientemente se han realizado algunos estudios a nivel reproductivo, como el de Toribio (2010), donde se localizó la isoforma de sGnRH con la técnica de Inmunohistoquímica en las gónadas de *Chirostoma humboldtianum*, encontrando que dicho péptido es detectado durante las etapas de madurez del ovocito y del testículo. Sugiriendo que dicha hormona en este órgano puede tener funciones de tipo autócrino/Parácrino promoviendo la gametogénesis y la apoptosis.

González (2010), localizó el péptido de PACAP en gónadas de este organismo, con la técnica de Inmunohistoquímica. Se encontró que está vinculada con el desarrollo temprano y la diferenciación del linaje espermático y en el ovario pudiera estar vinculado en los procesos de esteroidogénesis.

García y Lagunes (2010), aislaron parcialmente la secuencia de GPR54 con la técnica de PCR, en esta especie, encontrando que la expresión de este receptor se encuentra tanto en organismos que por primera vez ingresan al ciclo reproductivo como en hembras maduras. La importancia de este hallazgo es que este receptor es importante en la regulación de la liberación de las Kisspeptinas, otra hormona que también participa en el eje reproductivo, es mediadora de la síntesis y liberación de las GnRHs.

Chávez en el 2009, localizó el péptido para sGnRH con la técnica de Inmunohistoquímica, en el encéfalo e hipófisis de dicho organismo, encontrando que la variante se distribuye en el cerebro anterior, específicamente en el núcleo preóptico periventricular y magnocelular y algunas fibras tenían extensión hacia la adenohipófisis, sugiriendo que esta isoforma participa en la liberación de las gonadotropinas al igual que en otras especies ya reportadas.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Las especies de pescado blanco poseen un gran valor comercial, biológico y cultural, y son por tanto muy atractivas para la acuicultura, sin embargo, hasta el momento su producción se basa solo en pesquerías, principalmente de los Lagos de Pátzcuaro, Michoacán y Chapala Jalisco. Además como se mencionó anteriormente, al ser una especie endémica de nuestro país, en donde sus hábitats han sido afectados ya sea por sobreexplotación, contaminación e introducción de especies exóticas, es muy importante conocer algunas moléculas y vías tanto de importancia reproductiva como de crecimiento, para poder promover un mayor número de especies.

Es por eso que al tener como referencia estos estudios previos en el pejerrey que pertenece a la misma familia que el pez blanco, (Atherinidae), se cree que podrían compartir las mismas isoformas de GnRH, y de estar presente la isoforma pjGnRH en el pez blanco podría ser la que contara con el papel hipofisiotrópico.

Por ello, como un primer paso, se plantea el siguiente objetivo.



## **5. OBJETIVOS:**

### **Objetivo general:**

- "Aislar, secuenciar y clonar la isoforma pejerrey-GnRH (pjGnRH) en el cerebro anterior del charal (*Chirostoma humboldtianum*)".

### **Objetivos particulares:**

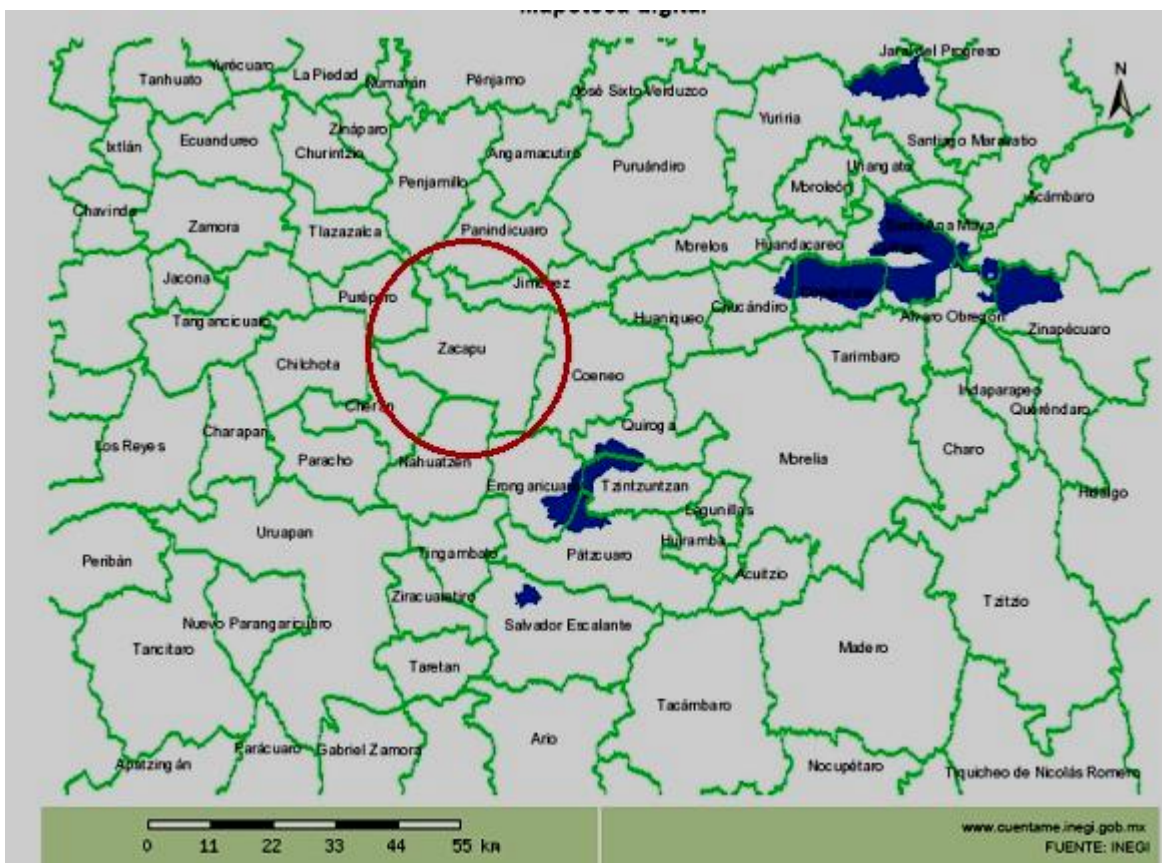
- Aislar la isoforma de pjGnRH en el encéfalo del Charal (*Chirostoma humboldtianum*).
- Determinar la secuencia de la preproisoforma de pjGnRH en el encéfalo anterior para ambos sexos.
- Clonar la secuencia de la isoforma de pjGnRH.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS:

### 6.1 FASE DE CAMPO

#### 6.1.1. Obtención de la muestra:

Se obtuvieron aproximadamente 15 cerebros anteriores por separado de *Chiostoma humboltianum* de machos y hembras en su mayoría sexualmente maduros. Las colectas se realizaron en la laguna de Zacapu, Michoacán ( $19^{\circ}48'58''$  N,  $101^{\circ}47'26''$  W; altitud, 1.900 msnm), con la técnica de chinchorreo, durante los meses de Enero del 2008 a Agosto del 2011. Esta fue realizada con la ayuda de pescadores de la cooperativa local de dicha localidad (Figura 9).



**Figura 9.** Mapa de la ubicación del área de estudio, Zacapu Michoacán (Obtenido del INEGI en línea).

Los peces obtenidos en cada colecta fueron seleccionados tomando tallas a partir de los 7cm hasta los 18 cm de longitud total (Figura 10).



**Figura 10.** Organismos de *Chirostoma humboldtianum* que fueron considerados para ser procesados en este trabajo de investigación.

Los ejemplares fueron anestesiados, sacrificados por decapitación, sexados y posteriormente el encéfalo anterior fue inmediatamente removido y puesto en un tubo eppendorf (previamente tratado con DEPC); (Diethyl-pirocarbonato). Estos fueron mantenidos en hielo seco o RNAlater® (Ambion) durante su transporte al laboratorio.

## **6.2. FASE DE LABORATORIO:**

### **6.2.1. Procesamiento de la muestra:**

De los encéfalos anteriores obtenidos, se realizó el aislamiento del ARN total basado en el Método de Extracción Guanidil-tiocianato-fenol-cloroformo (Chomczynski & Sacchi, 1987). Una vez aislado, se verificó su integridad con un gel desnaturalizante de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio.

Con el ARN obtenido se realizó RT-PCR con el Kit, Cloned AMV First-strand synthesis (Invitrogen®). La síntesis se realizó con oligo-dT<sub>17</sub>.

### **6.2.2. PCR para la obtención de la secuencia de *pjGnRH*, para *Chirostoma humboldtianum*:**

Para el aislamiento de la isoforma de *pjGnRH*, se realizaron tres diferentes PCRs que se describen a continuación.

### **6.2.3. Primero y segundo PCR: Obtención de la secuencia para *pjGnRH* y *GAP***

Se realizaron con la técnica de PCR dos amplificaciones de manera independiente (25µl volumen final), usando los oligonucleótidos nombrados ***pjGnRHF1*** y ***pjGnRHR1*** y ***pjGnRHF2*** y ***pjGnRHR2***, bajo las siguientes condiciones, desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C 30 segundos, T<sub>m</sub> 57°C por un minuto, 72°C por un minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Posteriormente se hizo electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, teñidos con bromuro de etidio, para verificar los producto obtenido. Estos fueron purificado por columna a través del MinElute Gel Extraction Kit QIAGEN y el Kit Wizard SV gel and PCR Clean-up System Kit Promega®, siguiendo las indicaciones protocolo descrito.

Los productos purificados, fueron igualmente verificados en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y fue posteriormente mandado a secuenciar.

#### **6.2.4. Tercer PCR: Obtención del GAP.**

Se realizó un tercer PCR (25µl volumen final), usando los oligonucleótidos nombrados **pjGnRHF1** y **pjGnRHR2**, bajo las siguientes condiciones, desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C 30 segundos, Tm 58°C por un minuto, 72°C por un minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos .

Posteriormente se hizo electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, teñido con bromuro de etidio, para verificar el producto obtenido. Este fue purificado a través del Kit de Wizard SV gel and PCR Clean-up System Kit Promega, siguiendo las indicaciones protocolo descrito.

El producto purificado, fue igualmente verificado en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y fue posteriormente mandado a secuenciar.

Se utilizaron las siguientes secuencias de nucleótidos basadas en el artículo de Guilgur *et al.*, (2007), cabe destacar que los oligonucleótidos F1 y F2, son degenerados (Figura 11):

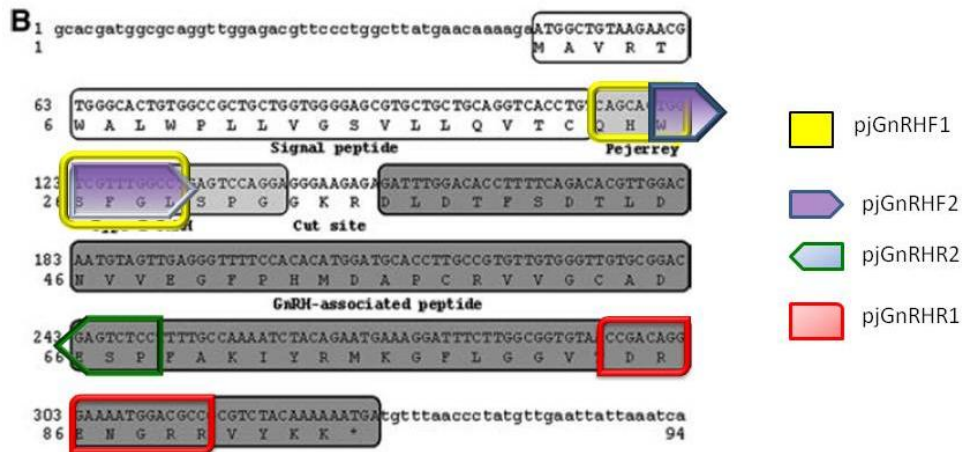
**pjGnRHF1:** 5'-CAG CAC TGG TCI TWY GGI CTG-3'

pjGnRHR1: 5'-GGC GTC CAT TTT CCC TGT CG-3'

**pjGnRHF2:** 5'-TGG TCI TWY GGI CTG AGY CCW GG-3'

pjGnRHR2: 5'-CAG ACT CGT CCG CAC AAC CCA-3'

Primers	Secuencia	Localización
pjGnRHF1 pjGnRHR1	5'-CAG CAC TGG TCI TWY GGI CTG-3' 5'-GGC GTC CAT TTT CCC TGT CG-3'	GnRH ↔ GAP
pjGnRHF2 pjGnRHR2	5'-TGG TCI TWY GGI CTG AGY CCW GG-3' 5'-CAG ACT CGT CCG CAC AAC CCA-3'	GnRH ↔ GAP



**Figura 11.** Esquema que muestra la secuencia y ubicación de los oligonucleótidos (Guilgur *et al.*, 2007).

Todos los productos obtenidos fueron mandados a secuenciar en un equipo ABI 3100 que se encuentra ubicado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO).

### 6.3. *Clonación de los productos:*

Los productos purificados obtenidos de los diversos PCRs fueron usados para clonación.

Se utilizó el protocolo de pGEM-T y pGEM-Easy Vector systems ® (Promega), el cual básicamente consta de dos fases:

1. La fase de ligación, a través de células con Amortiguador de ligación rápida 2X.
2. La fase de transformación de las células competentes de alta eficiencia JM109.

Las células transformadas fueron puestas en placas que contenían medio LB en agar tratadas con ampicilina, además de Xgal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) e IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido), y fueron puestas a crecer a 37°C, toda la noche.

De las colonias obtenidas, se seleccionaron aquellas cuyo color fuera blanco, las cuales fueron sembradas en placas con medio LB y agar tratadas con ampicilina. Una vez crecidas las células, fueron inoculadas en medio LB y ampicilina (aproximadamente 2ml por tubo), y fueron incubados en agitación a 150 rpm a 37°C durante toda la noche.

Después, se purificaron a través del protocolo de Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System ® (Promega) como lo indica el protocolo.

Finalmente, se realizó un PCR con las condiciones anteriormente mencionadas y se verificaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de Etidio.

```

      *      20      *      40      *      60      *      80
P408B1PR1 : TCAGCACTGGTCTGATGGGGCTGAGTCCAGGAAGGGAAGAGGGATTGGACAGCATTTCGGACACTCTGAACCAACGTGAGTT : 81
                pjGnRH                Sitio de Corte

      *      100     *      120     *      140     *      160
P408B1PR1 : CTCTTTCCTTTAACTTCTTCGTGACATTTACGGCTCCTCCTCAGGTCCGCTGGTATTCTTTAATGCTCCTCTGCCGCAGAA : 162

      *      180     *      200     *      220     *      240
P408B1PR1 : TGGTTGAGGGGTTCCACACATGGGTGCACCCTGCCCTCTCCTGGGTGTGTAGACGAGTCACCTTTGCCAAAAATCTACA : 243
                Péptido Asociado a GnRH (GAP)

      *      260     *      280     *      300     *      320
P408B1PR1 : GAATTAAGGGCTGCTGGTAAGTTGGGCTTATTTATTTTAAATTTTAAATTCGTCTCTCTATGATGCCCCCTAAGTTTTTC : 324

      *      340     *      360     *      380
P408B1PR1 : AAGTCATATCCCGAGAGCAAGTGAAATGACGACAACACGATCATGCAAAATGAGCTACGGG : 384

```

**Figura 13.** Secuencia de nucleótidos de aproximadamente 400pb obtenidos con los oligonucleótidos F1/R1. En el recuadro en negro, se muestra la estructura del precursor en la secuencia parcial de la isoforma pjGnRH en *Chirostoma humboldtianum* (P408B1PR1). Decapéptido de GnRH, Sitio de corte y péptido asociado a GnRH (GAP).

Se realizó además el alineamiento de secuencias entre la isoforma pjGnRH de *Odontesthes bonariensis*, sbGnRH de *Pagrus major* y la secuencia obtenida para *Ch. humboldtianum*, usando el programa GeneDoc (Fig. 14).



```

*          20          *          40          *          60          *
P1Chirosto : TCAGCACTGGTCGTATGGGCCTGAGTCCAGGAGGGAAGAGGGATTTGGACAGCATTTCGGACACTGTGAACAAGGTGA : 78
Astatotila : TCAGCACTGGTCATACGGA-CTGAGTCCAGGAGGGAAGAGGGATCTGGACACCTTTCAGACACAGTGGCAATGTAA : 77
pjGnRH      : -CAGCACTGGTCGTATGGC-CTGAGTCCAGGAGGGAAGAGAGATTTGGACACCTTTCAGACACAGTGGCAAGGTAA : 75
Dentex     : TCAGCACTGGTCGTATGGA-CTGAGTCCAGGAGGGAAGAGGGACCTGGACAGCTTTCAGACAGGTGGCAAGGTAA : 77
Consensus  : TCAGCACTGGTCGTATGGA-CTGAGTCCAGGAGGGAAGAGGGATTTGGACAGCATTTCAGACAGGTGGCAAGGTAA : 77
          tCAGCACTGGTCgTatGG  CTGAGtCCAGGAGGGAAGAGgGat  TGGACA  CtTtTcAGACAC  cTgG  CAa  GTaa

*          80          *          100         *          120         *          140         *
P1Chirosto : C---TTCCTTTTCCTTTAA-CTTCTTCGTGACATTTACGGCTCCTCCTCAGGTCGGCTGGTATTCTTTAATGTCTCCT : 152
Astatotila : CCATAGCCTAACAGCAACTCTTTATCTGTACATTAGCAGCTGTTGCTTTTCACCTGCAATGTTTCTT-AAATTTTCTCT : 154
pjGnRH     : ----- : -
Dentex     : CCCTTTTAAATTTATATAGCCAAA----- : 100
Consensus  : CC-TTT-T-TTT--Tt-c-c----- : 90
          g  t  t  t  c

*          160         *          180         *          200         *          220         *
P1Chirosto : CTGCCGCAGATGTTGAGGGTCCACACANGGGTGGACCTTGCCTTCCTGGGGTTGTGTAGCGAGTCACTTTT : 230
Astatotila : CAACAAAAGATGGTTGAAAGATTCCACGGCGHGAAGCACTTGCAGGTTTTCGGTTGTGCAGAGGAATCACCTTTT : 232
pjGnRH     : -----GTTGAGGCTTTCCACACANGGATGCACCTTGCCTGGTGTGGGGTTGTGCCGAGCACTCTCTTTT : 217
Dentex     : -----AATCATTCTGAGCAGCTACGGTGAAGATTTACCC--TGTA AAAAGTGTGTAAACATCTC-TTTT : 163
Consensus  : -----GTTGA-G-TTT-CCACCC-TCGGTGAACCTTGCAGH-TGGT-GGTTGTGTGGA-GA-TCCTCTTTT : 149
          gtTgA g  tT  ccac  C  t  G  TgAcctTgC  gt  tt  T  ggTtGTG  gA  ga  TC  CtTTTT

*          240         *          260         *          280         *          300         *
P1Chirosto : GCCAAAATCTACAGAAATAAAGGGCTCCGTTAGTTGGGCTTATTATTTTAAATTTTAAATTG-TGTC-TGCTTA : 307
Astatotila : GCCAAAATGTACAGAGTGAARGCACTTCTGTAAAGTT : 269
pjGnRH     : GCCAAAATCTACAGAAATAAAGGATTTCTTGGCGGTAAACCGAC--AGGGAAAAAGGAGCCGCTCTCAAAAAAT : 217
Dentex     : GCACAGATTCATGATGTTTGTTC--CACAGATCATC--GAGCGTTTCTCAAGTGGACTCTGCC : 230
Consensus  : GCCAAAAT-TACAGA-ATAAAGS-CTTCT-C-CAGTT-A-C-----TtttC--C-CGAG-Act-ct--T : 201
          GCcaAAAT  tACaGA  t  aaAg  cTtCt  G  aGtt  c  t  tttc  -C  CGAG  Act  ct  -t  t

*          320         *          340         *          360         *          380         *
P1Chirosto : GATC---CCCTAACTTTTCAGGTCATAT--CGAGAGCAA-GTGAATGACGACAAACAGCATGCAATGAGCT : 379
Astatotila : ----- : -
pjGnRH     : GATCTTTAACCTATCTTGAATTATTAATAGGATATACAA : 260
Dentex     : GCACT---GTCCGGCCGTGCCGAGGAGCCACTTTCCCAA : 270
Consensus  : C-CT---CCU-C-IGT-g-A-CA-E-T-C-CAA : 221
          g  g  cct  g  t  c  c  caa

*          400         *          420         *          440
P1Chirosto : ACGGG----- : 384
Astatotila : ----- : -
pjGnRH     : -----CTGATGGGATTACTGCATGTTATGACTTACTGTTTAAATCAAAATCATA : 307
Dentex     : -----AATGT----- : 275
Consensus  : -----T----- : 222

```

**Figura 14.** Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de pjGnRH de *Ch. humboldtianum*, con secuencias reportadas para las GnRHs en *Astatotilapia burtoni*, *Odonthestes bonariensis*, y *Dentex dentex*. Los recuadros mostrados en negro indican alta similitud y los mostrados en gris claro y gris oscuro muestran poca similitud.

**Tabla 2.** Se muestra el porcentaje de similitud de la secuencia parcial de nucleótidos obtenida que corresponde a la pjGRH de *Ch. humboldtianum* con otras especies de peces. Este listado fue obtenido usando la secuencia obtenida e ingresada a la base de datos del Blast-n.

Organismo	% Similitud	No. de Acceso al GenBank
<i>Astatotilapia burtoni</i> GnRH gen (Gnrh1)	70%	AF0776961.4
<i>Odonthestes bonariensis</i> mRNA.pjGnRH	86%	AY320285.1
<i>Odonthestes bonariensis</i> prepro pjGnRH.	86%	AY744689.1
<i>Dentex dentex</i> gene GnRH	87%	AB089313.1
<i>Sparus aurata</i> precursor sbGnRH	86%	AF046801.1
<i>Rhadobsargus sarba</i> precursor sbGnRH	86%	EF433770.1
<i>Rachycentron canadum</i> mRNA sbGnRH	86%	AY667175.1
<i>Mugil Cephalus</i> precursor sbGnRH	83%	AY373450.2
<i>Dicentrarchus labrax</i> mRNA sbGnRH	83%	AF224279.1
<i>Haplochromis burtoni</i> GnRH-I	83%	U31865.1
<i>Thunnus thynnus</i> mRNA GnRH-I	82%	EU239500.1
<i>Oreochromis niloticus</i> preprohormona sbGnRH	78%	AF467291.1
<i>Verasper Moseri</i> mRNA sbGnRH	79%	AB066360.1
<i>Paralichthys olivaceus</i> mRNA sbGnRH	79%	DQ074693.1
<i>Tetraodon nigroviridis</i> GnRH-I sbGnRH	84%	AB212811.1
<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i> GnRH-I	83%	NM_001113693.1
<i>Salmo marmoratus</i> GnRH-I	85%	EU853447.1
<i>Salmo salar</i> GnRH-I	85%	NM_001123667.1
<i>Macaca mulatta</i> GnRH-I	83%	NM_001195436

## 7. RESULTADOS:

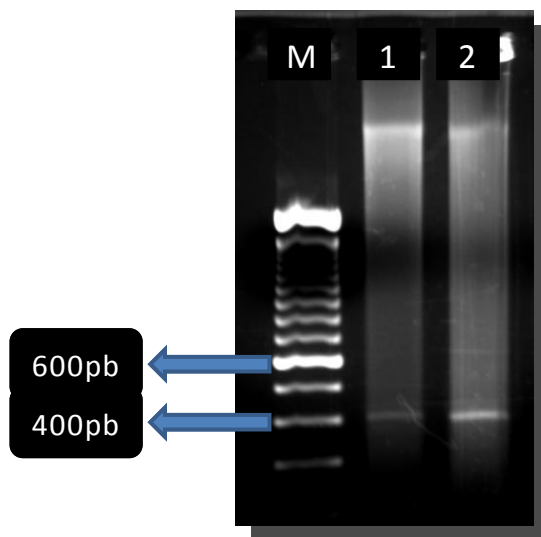
Los resultados para el aislamiento de la isoforma pjGnRH, se obtuvieron a partir de diversas amplificaciones con la técnica de PCR, basados según el Artículo de Guilgur *et al.*, 2007. Los resultados se muestran de manera separada debido a los diversos datos mostraron cada uno de los productos aislados.

### 7.1. PRIMER PCR

Para el primer PCR (usando los oligos llamados R1-F1), se obtuvo un producto de aproximadamente 400pb (Figura 12).

Usando las bases de datos del Genbank, blast-n y blast-x y se encontró similitud con otras secuencias reportadas de especies de peces teleósteos (Tabla 2.)

Comparando con dichas secuencias, encontramos que para *Chirostoma humboldtianum*, corresponde a la parte del péptido de GnRH y del péptido asociado a la GnRH (GAP) de la isoforma de pjGnRH (Figura 13).

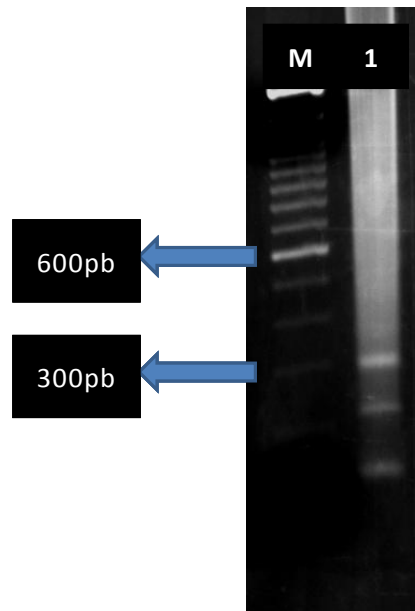


**Figura 12.** Se muestra un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio presentándose un producto de aproximadamente 400 pb, obtenido del primer PCR. M (Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb)).

## 7.2. SEGUNDO PCR

Para el segundo PCR, se obtuvieron tres productos de aproximadamente 100, 200 y 300pb, este último se mando a secuenciar y que corresponde a una parte del péptido de la GnRH y un fragmento del péptido asociado a la GnRH (GAP) (Figura 15). Se uso la base de datos del GenBank, blast-n y blast-x y se vio la homología con otras secuencias de otras especies de peces (Tabla 3.)

Comparando con dichas secuencias, encontramos que para *Ch. humboldtianum*, corresponde a la parte del péptido de GnRH y del péptido asociado a la GnRH (GAP) de la isoforma de pjGnRH (Figura 16).



**Figura 15.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, se muestran 3 productos de diferentes pesos moleculares, 100, 200 y 300 pb., obtenidas con los oligonucleótidos F2/R2). M (Marcador).

```

ENR2300RC : ACCCTGGTCGTATGGGCTGAGTCCAGGAAGGGAAGAGGGGATTGGACAGCATATCGGACACTCTGAACAACGTGAGTTCTC : 80
              *      20      *      40      *      60      *      80
              PjGnRH      Sitio de Corte      GAP

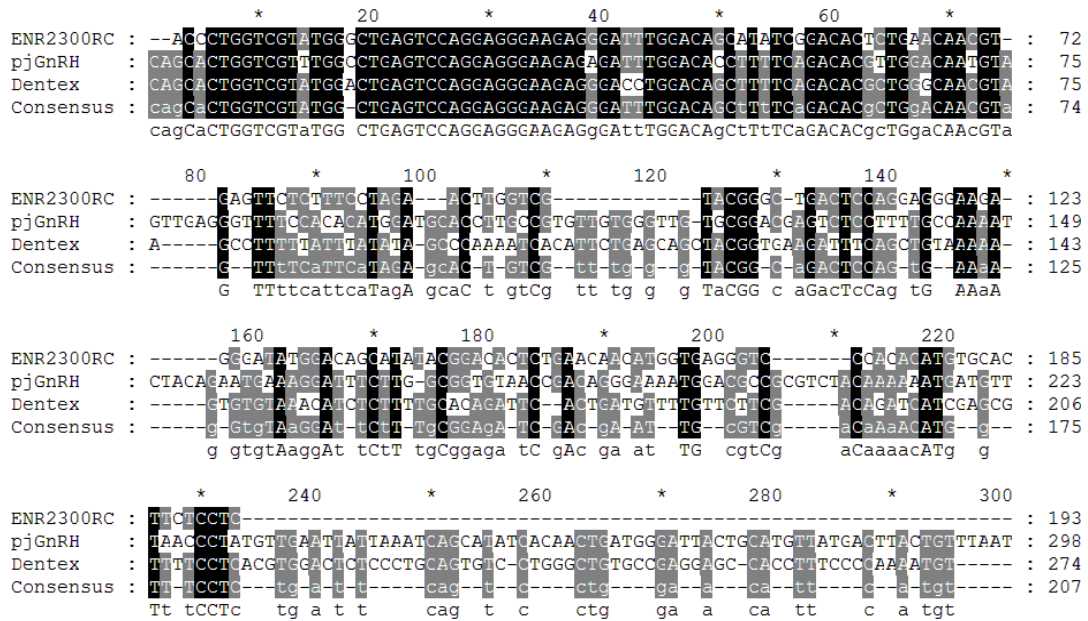
ENR2300RC : TTCCTAGAACTTGGTCGTACGGGCTGACTCCAGGAGGGAAAGAGGGATATGGACAGCATATACGGACACTCTGAACAACA : 160
              *      100     *      120     *      140     *      160
              Péptido Asociado a GnRH (GAP)

ENR2300RC : TGGTGAGGGTCCCACACATGTGCACCTTCTCCTC : 193
              *      180     *

```

**Figura 16.** Secuencia de nucleótidos obtenidos con los oligonucleótidos F2/R2. En el recuadro en negro, se muestra la estructura del precursor en la secuencia parcial de la isoforma pjGnRH en *Chirostoma humboldtianum* (ENR2300RC). Decapéptido de GnRH, Sitio de corte y péptido asociado a GnRH (GAP).

Además, se realizó el alineamiento de secuencias entre la isoforma pjGnRH de *Odontesthes bonariensis*, y la secuencia obtenida para *Chirostoma humboldtianum*, usando el programa GeneDoc (Figura 17).



**Figura 13.** La imagen muestra el alineamiento de la secuencia parcial de pjGnRH de *Chirostoma humboldtianum* y la secuencia de pjGnRH de *Odonthestes bonariensis* y la secuencia para *Dentex dentex*. Los recuadros mostrados en negro indican alta similitud y los mostrados en gris claro y gris oscuro muestran poca similitud.

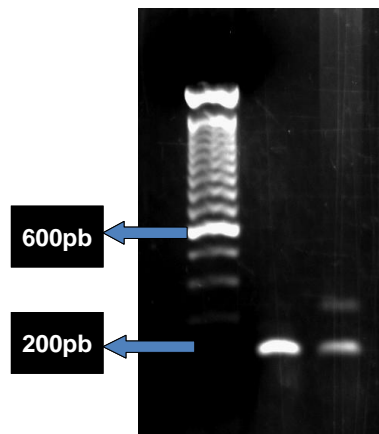
**Tabla 3.** Se muestra el porcentaje de similitud de la secuencia parcial obtenida que corresponde a pjGRH de *Chirostoma humboldtianum* con otras especies de peces. Este listado fue obtenido usando la secuencia obtenida e ingresada a la base de datos del Blast-n.

Organismo	% Similitud	No. de Acceso a Genbank
<i>Odonthestes bonariensis</i> pjGnRH mRNA.	86%	AY320285.1
<i>Odonthestes bonariensis</i> prepro pjGnRH.	86%	AY744689.1
<i>Acanthopragus latus</i> GnRH gen	82%	AB089313.1
<i>Rhabdosargus sarba</i> sbGnRH	82%	EF433770.1
<i>Acanthopragus schlegii</i> sbGnRH	82%	EU099997.1
<i>Dentex dentex</i> GnRH gene	82%	AB089313.1

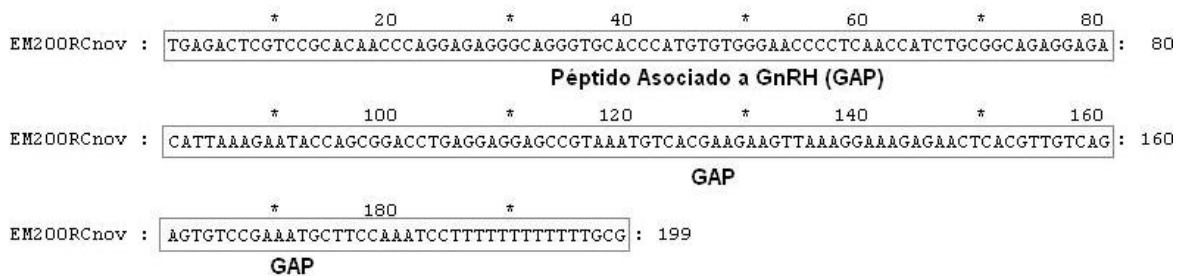
### 7.3. TERCER PCR

Para el tercer PCR, se obtuvo un producto de aproximadamente 200pb que corresponde un fragmento del péptido asociado a la GnRH (GAP) de (Figura 18). Se uso la base de datos del Genbank, blast-n y blast-x y se vio la homología con otras secuencias de otras especies de peces (Tabla 4).

Comparando con dichas secuencias, encontramos que para *Chirostoma humboldtianum*, corresponde a la parte péptido asociado a la GnRH (GAP) de la isoforma de pjGnRH (Figura 19).

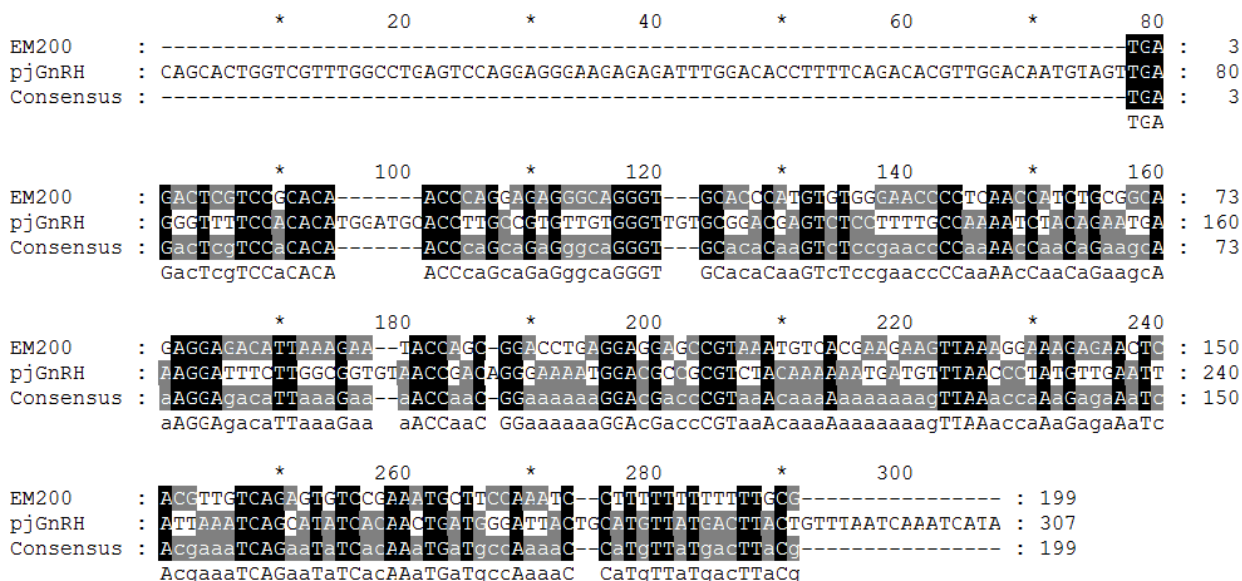


**Figura 18.** Gel de agarosa al 1%, se muestran productos de aproximadamente 200 pb obtenido de los oligonucleótidos F1/R2. M (Marcador).



**Figura 19.** Secuencia de nucleótidos obtenidos con los oligonucleótidos F1/R2. En el recuadro en negro, se muestra la estructura del precursor en la secuencia parcial de la isoforma pjGnRH en *Chirostoma humboldtianum* (EM200RCnov). Péptido asociado a GnRH (GAP).

Se realizó además, el alineamiento de secuencias entre la isoforma pjGnRH de *Odontesthes bonariensis*, y la secuencia obtenida para *Chirostoma humboldtianum*, usando el programa GeneDoc (Figura 20).



**Figura 20.** Alineamiento de la secuencia parcial de pjGnRH de *Chirostoma humboldtianum* y la secuencia de pjGnRH de *Odontesthes bonariensis*. Los recuadros mostrados en negro indican alta similitud y los mostrados en gris claro y gris oscuro muestran poca similitud.

**Tabla 4.** Se muestra el porcentaje de similitud de la secuencia parcial obtenida que corresponde a pjGRH de *Chirostoma humboldtianum* con la isoforma pjGnRH de *Odontesthes bonariensis*.

Organismo	% de Similitud	No de Acceso al Genbanj
<i>Odontesthes bonariensis</i> pjGnRH mRNA.	86%	AY320285.1
<i>Odontesthes bonariensis</i> prepro pjGnRH.	86%	AY744689.1



## 8. DISCUSIÓN:

En el presente trabajo, fue aislada por primera vez la secuencia parcial de la isoforma pjGnRH en el encéfalo del pez blanco del altiplano, *Chirostoma humboldtianum*. Dicha secuencia fue obtenida a través de distintas combinaciones de oligonucleótidos, contando con la misma organización estructural de otros miembros de la familia de las GnRHs ya reportadas, abarcando desde la región del péptido de la isoforma (pjGnRH), el sitio de procesamiento (GKS) y el péptido asociado a la GnRH (GAP). La secuencia obtenida consta de aproximadamente 384pb y 115 residuos de aminoácidos (Figura 21).

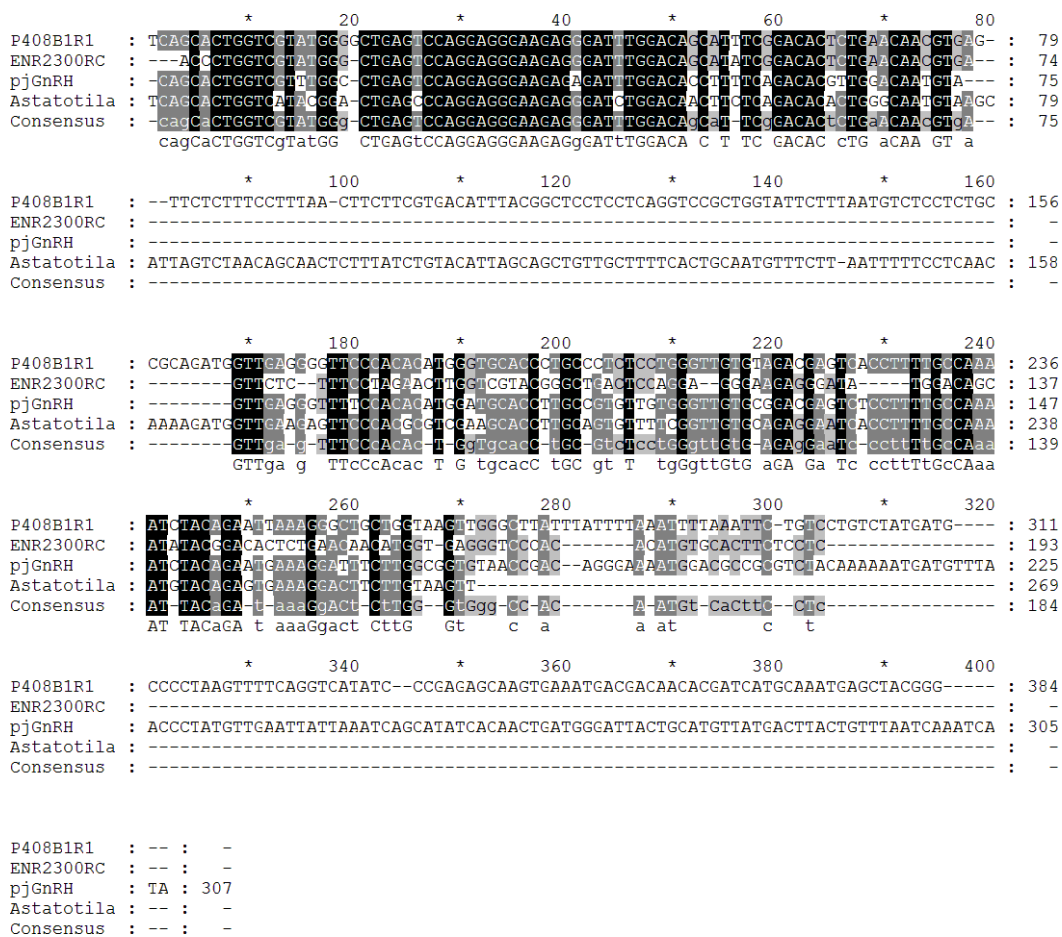
>P408PER1 F1		Variante pjGnRH										Sitio de corte					
1		CAG	CAC	TGG	TCG	TTT	GGG	CTG	AGT	CCA	GGA	GGG	AAG	AGG	GAT	TTG	45
1		Q	H	W	S	F	G	L	S	P	G	G	K	R	D	L	15
46		GAC	AGC	ATT	TCG	GAC	ACT	CTG	AAC	AAC	GTG	AGT	CTC	TTT	CCT	TTA	90
16		D	S	I	S	D	T	L	N	N	V	S	L	F	P	L	30
91		ACT	TTC	TTC	GTG	ACA	TTT	ACG	GCT	CCT	CCT	CAG	GTC	CGC	TGG	TAT	135
31		T	F	F	V	T	F	T	A	P	P	G	V	R	W	Y	45
136		TCT	TTA	ATG	TCT	CCT	CTG	CCG	CAG	ATG	GTT	GAG	GGG	TTC	CCA	CAC	180
46		S	L	M	S	P	L	P	Q	M	V	E	G	F	P	H	60
181		ATG	GGT	GCA	CCC	TGC	CCT	CTC	CTG	GGT	TGT	GTA	GAC	GAG	TCA	CCT	225
61		M	G	A	P	C	P	L	L	G	C	V	D	E	S	P	75
226		TTT	GCC	AAA	ATC	TAC	AGA	ATT	AAA	GGG	CTG	CTG	GTA	AGT	TGG	GCT	270
76		F	A	L	I	Y	R	I	L	G	L	L	V	S	W	A	90
271		TAT	TTA	TTT	AAA	TTT	AAA	TTC	TGT	CCT	GTC	AAT	GAT	GCC	CCT	AAG	315
91		Y	L	F	K	F	K	F	C	P	V	N	D	A	P	K	105
316		TTT	CAG	GTC	AGA	TCC	CGA	GAG	CAA	GGG	AAA	TGA					348
106		F	Q	V	R	S	R	E	Q	G	K	End					115

Péptido Asociado a GnRH (GAP)

**Figura 21.** Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos para la isoforma de pjGnRH en el pez blanco del Altiplano, *Chirostoma humboldtianum*. Obtenida de los productos aislados. Se indica en donde se presenta la isoforma de pjGnRH, el sitio de corte y el péptido Asociado a GnRH (GAP).

Al hacer la comparación de las diversas secuencias obtenidas con los diversos juegos de oligonucleótidos para *Ch. humboldtianum* a través de la base de datos Blastn, se encontró

que el porcentaje de similitud con algunas secuencias reportadas en otras especies de peces teleósteos, se encuentra entre el 70 y el 86%. Con respecto a nuestras secuencias, tanto la isoforma sbGnRH en *Astatotilapia burtoni* y pjGnRH en *Odonthestes bonariensis*, se encontraron en todas las secuencias obtenidas para el pez blanco del Altiplano. Estas secuencias fueron alineadas con el programa Genedoc (Figura 22).



**Figura 22.** Alineamiento de la secuencia de nucleótidos obtenidos para *Chirostoma humboldtianum* (con los oligonucleótidos F1-R1 y F2-R2) y otras especies de peces teleósteos, *Astatotilapia burtoni*, y *Odontesthes bonariensis*. Los recuadros mostrados en negro indican alta similitud y los mostrados en gris claro y gris oscuro muestran poca similitud.

En los teleósteos, existe la expresión de dos o tres isoformas de GnRH en el encéfalo y cada una de ellas contará con una distribución y función específica.

Se ha encontrado en el arenque del pacífico (*Clupea harengus pallasii*), un teleósteo bastante primitivo perteneciente al orden de los clupeiformes, la presencia de tres isoformas hgGnRH, sGnRH y cGnRH-II (Carolsfeld *et al.*, 2000). Otro ejemplo es el pez blanco (*Coregonus clupeaformis*), perteneciente a la familia Salmonidae, el cual expresa también tres isoformas wfGnRH, sGnRH y cGnRH-II (Adams *et al.*, 2002), otros representantes de la misma como *Oncorhynchus mykiss* y otras especies de salmónidos solo cuentan con dos isoformas reportadas en el encéfalo (Ando & Urano, 2005; Gray *et al.*, 2002; O'Neill *et al.*, 1998). Se ha propuesto que la tercera isoforma ha surgido después de una duplicación genómica, pero que se perdió en algún momento temprano de la evolución de la familia de los salmónidos, afectando a especies como la trucha arcoíris o el salmón, debido a reordenamientos cromosómicos (Adams *et al.*, 2002).

En varias especies del Orden de los Acantopterigios, sólo se ha encontrado la presencia de los tres sistemas. La expresión de estas isoformas, ha sido descrita en varias familias como Characiformes (Powell *et al.*, 1997), Cupleiformes (Carolsfeld *et al.*, 2000), Pleuronectiformes (Andersson *et al.*, 2001), Scorpaeniformes (Collins *et al.*, 2001), Salmoniformes primitivos (Adams *et al.*, 2002), Synbranchiformes, Atheriniformes y Ciprynidontiformes (Somoza *et al.*, 2002).

En el caso particular de la variante pjGnRH, se ha reportado en varios ordenes y familias de teleósteos como Atheriniformes, en *Odonthestes bonariensis* y *Odontesthes hatchery* (Montaner *et al.*, 2001) Simbranquiformes en *Symbranchus marmoratus* (Somoza *et al.*, 2002), Beloniformes, en *Oryzias latipes* (Okubo *et al.* 2000), y Ciprinidontiformes, en *Xiphophorus maculatus* y *Fundulus heteroclitus* (Somoza *et al.*, 2002; Okubo *et al.*, 2010).

En el pez blanco del altiplano, se presenta en el cerebro la isoforma pjGnRH, demostrando que se tiene la existencia de tres isoformas para esta especie. En estudios previos en esta especie, se ha aislado, secuenciado, y localizado a través de la técnica de inmunohistoquímica la isoforma sGnRH en el encéfalo, hipófisis y gónadas, (Chávez, 2009; Chávez *et al.*, 2011 *Frontiers of Endocrinology* aceptado; Toribio, 2010).

Las secuencias obtenidas con los oligos F2-R2 y F1R2 para *Chirostoma humboldtianum*, no fueron encontradas en todas las familias antes mencionadas, pero tiene una mayor similitud con especies de la familia de los perciformes como es el caso de *Astatotilapia burtoni*, que tiene tres isoformas incluida la sbGnRH (White *et al.*, 1995) (Tabla 2).

Se sabe que en peces que presentan tres isoformas en el cerebro, tienen una distribución neuroanatómica diferente. Las neuronas que expresan la isoforma cGnRH-II, se localizan en el tegmento del cerebro medio (MT), las que presentan la isoforma sGnRH, en el Nervio del Ganglio Terminal (TNG) y por último, las que expresan alguna isoforma que corresponden a especie, se encuentran principalmente en el área preóptica (APO) (Amano *et al.*, 2002).

La isoforma que se distribuye abundantemente en el área del hipotálamo y está relacionada con el control de la función de la hipófisis, se le denomina GnRH1. La isoforma GnRH2, se encuentra distribuida en el cerebro medio (cGnRH-II) y finalmente, GnRH3, a las neuronas que se localizan en el telencéfalo (sGnRH). Sin embargo, este tipo de nomenclatura no distingue entre las diferentes isoformas de la hormona encontradas en el hipotálamo de las distintas especies.

El sistema GnRH1, tiene sus fibras y terminaciones axonales hacia la hipófisis y es responsable de regular la síntesis y liberación de las gonadotropinas a lo largo del ciclo reproductivo. Además, se tienen algunas investigaciones de que no sólo tiene el papel de liberar a estas, sino también en la regulación de otras hormonas hipofisarias, como puede ser la Prolactina (PRL), Hormona de crecimiento (GH) y la Somatolactina (SL) (Kakizawa *et al.*, 1999; Marchant *et al.*, 1989; Melamed *et al.*, 1995; Stefano *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 1997)

Todo el sistema de GnRH, está correlacionado positivamente con el Índice Gonadosomático (GSI) en algunas especies de peces teleósteos, reforzando así la idea de que este tipo de isoformas son importantes como reguladores de la actividad reproductiva en los peces (Montaner *et al.*, 2001).

En *Ch. humboldtianum*, se encontró que la expresión de pjGnRH se presenta durante los meses de Enero hasta el mes de Mayo (Datos no mostrados), donde se sabe que la etapa de madurez gonadal para esta especie se da en los meses de Enero a Mayo (Toribio, 2010; González, 2010).

En especies que poseen tres isoformas, como en los perciformes, existe un incremento significativo en los niveles de mRNA. En el *Sparus aurata*, los niveles de sbGnRH aumentan en ambos sexos durante la maduración gonadal (Gothilf *et al.*, 1997; Zohar *et al.*, 2010). Otros casos similares se han reportado en el *Dicentrarchus labrax* (González-Martínez *et al.*, 2002; Zmora *et al.*, 2002), en *Scophalmus maximus* (Andersson *et al.*, 2001), *Verasper Moseri* (Amano, *et al.*, 2002), *Pagrus major*, *Spondyliosoma cantharus*, *Oplegnathus fasciatus*, y *Oreochromis niloticus* (Senthilkumaran *et al.*, 1999).

A nivel estructural, en los peces teleósteos, se sabe que la secuencia del péptido señal (PS) consta de aproximadamente 20 a 25 residuos de aminoácidos, contiene una región hidrofóbica, que es requerida por la preprohormona para que esta pueda ser secretada. Esta región, ha sido identificada para todos los precursores de la GnRH encontrados hasta la fecha, ya que al inicio de su secuencia, presenta un aminoácido con carga positiva que puede ser Lisina o Arginina. Esta secuencia, es altamente conservada en un gran número de especies, existiendo muy poca diferencia entre sus aminoácidos (Clarke & Pompolo, 2005). En el presente trabajo no se obtuvo dicha secuencia a pesar de los diversos esfuerzos realizados con varios oligonucleótidos (datos no presentados).

En todos los precursores de los vertebrados, después del PS se encuentra el decapeptido de la GnRH y es seguido del sitio de procesamiento que son tres residuos de aminoácidos altamente conservados: Gly-Lys-Arg (GKR). En nuestras secuencias está presente dicho sitio (Figura 21).

La diferencia fundamental en la estructura de los precursores para la GnRH, se encuentra en la parte del GAP. Este sirve de referencia para poder determinar la secuencia de las distintas isoformas. Además, esta puede variar en el número total de aminoácidos, dependiendo de cada isoforma presente en cada especie. Por ejemplo, el GAP del precursor

para la cGnRH-II, en el pez dorado, bagre y mojarra, tiene aproximadamente 49 aminoácidos (Pandolfi *et al.*, 2005).

En la isoforma pjGnRH de *Chirostoma humboldtianum*, se tiene un GAP de aproximadamente 102 aminoácidos (Figura 21), el cual no corresponde con el número de aminoácidos reportados para las distintas isoformas, lo que nos hace pensar que pueda haber una retención de alguna secuencia intrónica en especial del intrón B, que haga que la longitud en el GAP exceda el número límite de aminoácidos reportados. Sin embargo, es necesario hacer otros estudios donde confirme dicha hipótesis, ya que, con la secuencia obtenida de aproximadamente 400pb con los oligonucleótidos F1/R1 fue comparada con secuencias intrónicas A y B, reportadas en la base de datos del GenBank y no arrojó ningún resultado que dejara en claro que se trataba de dicha secuencia, ya que la longitud aproximada es de 241pb, pues al comparar la secuencia de GAP en *Chirostoma humboldtianum* y de dos especies de peces que presentan las isoformas pjGnRH y mdGnRH, se observa que presenta una longitud mayor con respecto a las otras (Figura 23).

```

*      20      *      40      *      60      *      80
P40B1F1GAP : GGATTGGACAGCATTTCGGACACTCTGAACAACGTGAGTTCTCTTTCCTTIAACTTCTTCGTGACATTACGGCTCCTCCTCAGGT : 87
Odontesthe : ----- : -
Oryzias : ----- : -
Consensus : ----- : -

*      100     *      120     *      140     *      160     *
P40B1F1GAP : CCGTGGTATTCTTTAATGTCCTCTGCGGCAGATGGTTGAGGGTTCCACACATGGGTGCACCTGCCCCTCTCGTGGGTTGTGT : 174
Odontesthe : GATTTGGACACCTTTTCAGACACGTTGGACAATG-TAGTTGAGGGTTTCCACACATGGATGCACCTTGCCGTGTGTGGGTTGTGC : 86
Oryzias : GATTTGGACACCTTTTCAGACACGTTGGACAATG-TAGTTGAGGGTTTCCACACATGGATGCACCTTGCCGTGTGTGGGTTGTGC : 86
Consensus : gattTGGacacCTTTtcaGacAGTtGgGCaatG-TaGTTGAGGGTTTCCACACATGGATGCACCTTGCCGTGTGTGGGTTGTGC : 86
gattTGGacacCTTTtcaGacAGTtGgGCaatG TaGTTGAGGGTTTCCACACATGGATGCACCTTGCCGTGTGTGTGGGTTGTGC

*      180     *      200     *      220     *      240     *      260
P40B1F1GAP : AGACGAGTCTCCTTTTGCCAAAATCTACAGAATGAAGGGCTGCTGGTAAAGTTGGGCTTATTTAATTTAAATTTTAAATTC-TCTCC : 260
Odontesthe : GGACGAGTCTCCTTTTGCCAAAATCTACAGAATGAAGGATTTCTTGGCGGTGTAACCGAC--AGGGAATGACGCCCGCTCTAC : 171
Oryzias : GGACGAGTCTCCTTTTGCCAAAATCTACAGAATGAAGGATTTCTTGGCGGTGTAACCGAC--AGGGAATGACGCCCGCTCTAC : 171
Consensus : gACGAGTCTCCTTTTGCCAAAATCTACAGAATGAAGGatTtCTTgGcgGTgtaaCcgAc--AgggaAATggacgccgCgTcTAc : 171
gACGAGTCTCCTTTTGCCAAAATCTACAGAATGAAGGatTtCTTgGcgGTgtaaCcgAc AgggaAATggacgccgCgTcTAc

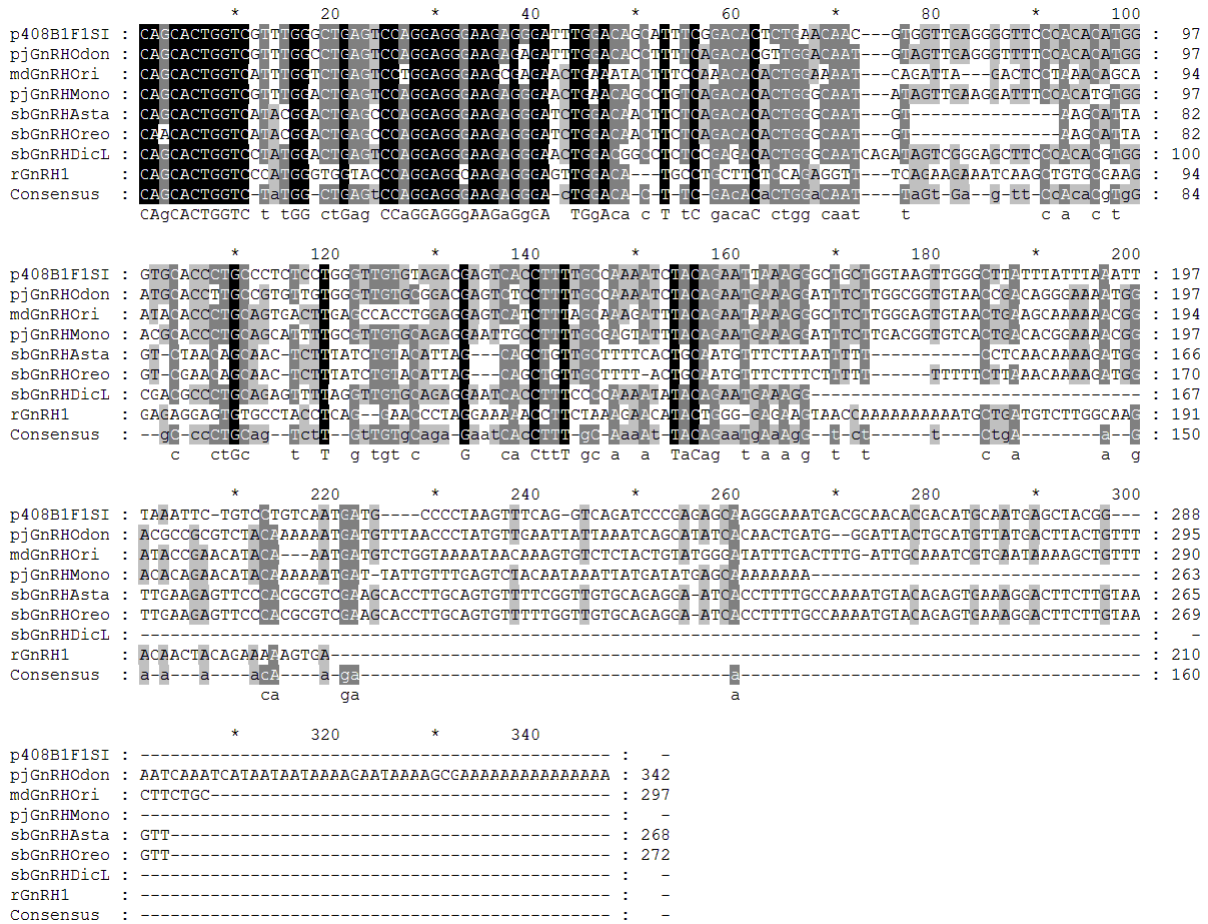
*      280     *      300     *      320     *      340
P40B1F1GAP : TGTCTATGATG----CCCTTAGTTTTCAGGTCATATG--CCGAGAGCAAGTGAATGACGACACACAGATCATGCAATGAGGTAC : 341
Odontesthe : AAAAAATGATGTTTAAACCTATGTTGAATTATTAATCAGCATATCACAACTGATGGATTACTGCATGTTATGACTTACTGTTTAA : 258
Oryzias : AAAAAATGATGTTTAAACCTATGTTGAATTATTAATCAGCATATCACAACTGATGGATTACTGCATGTTATGACTTACTGTTTAA : 258
Consensus : aaaaaATGATGtttaaCCCTATGTTgaattaTtAaATCagCatAtcaCAACTGatggAttActgCATGtTatgaCttActgtTAA : 258
aaaaaATGATGtttaaCCCTATGTTgaattaTtAaATCagCatAtcaCAACTGatggAttActgCATGtTatgaCttActgtTAA

*
P40B1F1GAP : GGG----- : 344
Odontesthe : TCAAAATCATA : 268
Oryzias : TCAAAATCATA : 268
Consensus : tcaaatcata : 268
tcaaatcata

```

**Figura 23.** Se muestra la comparación de las secuencias del GAP obtenidas para *Chirostoma humboldtianum*, *Odontesthes bonariensis* (pjGnRH) y *Oryzias latipes* (mdGnRH). Se observa que dentro de nuestra secuencia se presenta una región de 91pb, que no alinea con las demás especies. Los recuadros mostrados en negro indican alta similitud y los mostrados en gris claro y gris oscuro muestran poca similitud

Al detectar que existía una secuencia que no correspondía a la secuencia del GAP, *in silico*, se recortó justo en la secuencia donde se presentaba la región donde presuntamente se encuentra la región intrónica y posteriormente se volvió a alinear con las mismas especies, tanto con la secuencia de nucleótidos (Figura 24) como de aminoácidos (Figura 25) con el programa GeneDoc y las bases de datos del Blastt-n y blast-x. La similitud que se tenía era del 76 al 87%.



**Figura 24.** Se muestra el alineamiento realizado con la secuencia recortada de nucleótidos obtenida para la isoforma de pjGnRH en *Chirostoma humboldtianum* comparada con otras especies de vertebrados. La isoforma de pjGnRH en *Odontestes bonariensis* y *Monopterus albus*, mdGnRH en *Orizyas latipes*, sbGnRH en *Astatotilapia burtoni*, *Oreochromis niloticus* y *Dicentrarchus labrax* y rGnRH1 en la *Rana catesbeiana*.



```

      *          20          *          40          *          60          *          80          *          100          *
pjGnRHChir : QHWSFGLSPGGKRLLSISIDTINNVSLFPLTFFVFTAPPGVWRWYSLMSPLPQVEGFPHNGAPCPILLGCVDESPFAIYRIKGLLVSWAYLKFKFCPVNDAPKFQVRSREQGK : 115
pjGnRHodon : QHWSFGLSPGGKRLLSISIDTINNVSLFPLTFFVFTAPPGVWRWYSLMSPLPQVEGFPHNGAPCPILLGCVDESPFAIYRIKGLLVSWAYLKFKFCPVNDAPKFQVRSREQGK : 72
sbGnRHasta : QHWSFGLSPGGKRLLSISIDTINNVSLFPLTFFVFTAPPGVWRWYSLMSPLPQVEGFPHNGAPCPILLGCVDESPFAIYRIKGLLVSWAYLKFKFCPVNDAPKFQVRSREQGK : 72
mdGnRHoryz : QHWSFGLSPGGKRLLSISIDTINNVSLFPLTFFVFTAPPGVWRWYSLMSPLPQVEGFPHNGAPCPILLGCVDESPFAIYRIKGLLVSWAYLKFKFCPVNDAPKFQVRSREQGK : 70
Consensus : QHWSFGLSPGGKRLLSISIDTINNVSLFPLTFFVFTAPPGVWRWYSLMSPLPQVEGFPHNGAPCPILLGCVDESPFAIYRIKGLLVSWAYLKFKFCPVNDAPKFQVRSREQGK : 57
              QHWS5GLSPGGKRdLd fsITL N                    6e fp aPC gc EspfAk6YR6kGll sv ng r k

```

**A**

```

      *          20          *          40          *          60          *          80
pjGnRHChir : QHWSYGLSPGGKRLLSISIDTINNVSLFPLTFFVFTAPPGVWRWYSLMSPLPQVEGFPHNGAPCPILLGCVDESPFAIYRIKGLLVSWAYLKFKFCPVNDAPKFQVRSREQGK : 87
pjGnRHodon : QHWSFGLSPGGKRLLSISIDTINNVSLFPLTFFVFTAPPGVWRWYSLMSPLPQVEGFPHNGAPCPILLGCVDESPFAIYRIKGLLVSWAYLKFKFCPVNDAPKFQVRSREQGK : 72
mdGnRHoryz : QHWSFGLSPGGKRLLSISIDTINNVSLFPLTFFVFTAPPGVWRWYSLMSPLPQVEGFPHNGAPCPILLGCVDESPFAIYRIKGLLVSWAYLKFKFCPVNDAPKFQVRSREQGK : 70
Consensus : QHWSFGLSPGGKRLLSISIDTINNVSLFPLTFFVFTAPPGVWRWYSLMSPLPQVEGFPHNGAPCPILLGCVDESPFAIYRIKGLLVSWAYLKFKFCPVNDAPKFQVRSREQGK : 57
              QHWS5GLSPGGKR Ld fs TL Nv vegfphm aPC 6gc EspfAKIYR6KGLlsvt ng r yk

```

**B**

**Figura 25.** Se muestra el alineamiento realizado con la secuencia de aminoácidos obtenida para pjGnRH en *Chirostoma humboldtianum*, comparada con otras especies de vertebrados. La isoforma de pjGnRH en *Odontestes bonariensis*, sbGnRH en *Astatotilapia burtoni* y mdGnRH en *Oryzias latipes* con la presencia del intrón B (imagen A) y sin intrón B (Imagen B).

El mecanismo molecular que controla la expresión diferencial de los genes que codifican a las diversas formas de GnRH ha recibido enorme atención, pero la evidencia que se tiene, permanece aun sin resolverse (Higa *et al.*, 1997). Son pocos los estudios que se han enfocado en la regulación y transcripción génica de las distintas isoformas de la GnRH.

Para esta familia de hormonas, el control transcripcional es esencial para la regulación espacio-temporal de la expresión génica. El splicing, puede ser un mecanismo de regulación de la expresión de dichos genes.

También, otra forma de regulación se da a nivel tejido-específico. La expresión de varias isoformas de GnRH, se han localizado en varios tejidos extrahipotalámicos, como la placenta, las glándulas mamarias, los testículos y los ovarios, por mencionar algunos. Sugiriendo que puede tener una función parácrina o autócrina o ambas, esto también puede incluir otras áreas del encéfalo incluido el hipotálamo, que no tengan inervación directa hacia la hipófisis (Choe *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2002).

De los tejidos antes mencionados, la expresión y procesamiento de los transcritos primarios, en una gran proporción, son significativamente diferentes en su procesamiento,

en la mayoría se ha encontrado que un modo de regulación es la precedencia de la retención del Intrón A.

Encontrando que el sitio de inicio de la transcripción usado en el hipotálamo también es utilizado en los mismos tejidos (Seeburg & Adelman 1984; Radovick *et al.*, 1990; Gaubau *et al.*, 1992; Dong *et al.*, 1993, 1996).

Existen una serie de posibles sitios repetidos AUG al inicio de la transcripción que están presentes en la región 5'UTR y en el intrón 1, que pueden favorecer la retención de dicho intrón. (Von Schalburg & Sherwood 1999; Uzbekoba *et al.*, 2002).

En los mamíferos, en especial el modelo de ratón, se ha documentado la presencia de que en el cerebro, se presentan dos variantes, una forma con el transcrito maduro y otro con la retención del Intrón A.

La expresión del mRNA maduro y la variante que presenta la retención del intrón A, tiene expresión diferencial entre el sistema nervioso y posiblemente en los tejidos periféricos.

En el trabajo de Zheng *et al.*, 1992, se utilizaron dos tipos celulares, Gn11 y NLT, los cuales son un buen modelo *in vitro* para el estudio y el entendimiento de la actividad neuronal y la regulación de GnRH. Cabe mencionar que las células NTL secretan 10 veces más GnRH que en las células Gn11. Con los datos obtenidos se registró evidencia de que la capacidad de secretar GnRH es menor en las células Gn11, esto se debe en parte, a la prevalencia de una variante de splicing que provoca que el transcrito maduro carezca del exón 2, el cual codifica para el decapeptido de la GnRH. Además, cuando en estos experimentos incluyeron al cerebro anterior, determinaron que esta variante de splicing solo es expresada en el área olfativa y área preóptica del hipotálamo anterior, donde se sabe que en estas áreas se encuentra el presente el mRNA maduro de la GnRH. Por lo tanto, con estos resultados se sugiere que la existencia de un splicing alternativo en el transcrito primario, puede contribuir a la regulación de la expresión génica en el cerebro anterior.

Resultados de este trabajo demuestran que la expresión de preproGnRH es regulado de manera diferente en diferentes regiones del sistema nervioso central. Por ejemplo en el

cerebro de ratón y humano, a través de técnicas como hibridación *in situ* e Inmunohistoquímica, se ha encontrado la existencia de tres subtipos de neuronas que expresan a la GnRH, que difieren en cuanto a su morfología, densidad de marcaje y localización y que pueden cambiar durante su ciclo reproductivo. En este trabajo demuestra que, incluso en las neuronas de GnRH localizadas en distintas regiones del sistema nervioso central, el transcrito primario es procesado de manera diferente.

El proceso de splicing afecta directamente la capacidad de codificar al transcrito, esta eficiencia y precisión es obviamente crítica para las funciones normales de las neuronas de GnRH.

En especies de peces, no existe tampoco información suficiente de cómo se da el procesamiento de los transcritos de GnRH, pero Okubo *et al.*, (1999), encontraron en la anguila japonesa, a través de análisis por Southern Blot genómico, la existencia de la presencia de variantes en el splicing en la prepro-mGnRH, las cuales son codificadas por el mismo gen, en varios tejidos. En donde se tiene que una de las secuencias obtenidas, tiene la presencia del intrón A.

En estudios realizados en el cerebro y las gónadas de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), se ha reportado la retención del intrón A y se sabe que usan un promotor alternativo río arriba (Gray *et al.*, 2002).

Nabbissi *et al.*, (2000), encontraron en el ovario del *Sparus aurata*, la presencia de secuencias que presentaban retención de algún tipo de intrón, en la isoforma sbGnRH y que esta condición puede estar presente en cualquier estado reproductivo. Sugiriendo que la principal función se da en los elementos intrón/exón en el control diferencial del splicing, más que en una mayor abundancia de los factores específicos que regulan el splicing alternativo.

En nuestros resultados se tiene una expresión diferencial entre el encéfalo anterior y las gónadas (Datos no mostrados). En las muestras para ambos casos, en los meses de Enero, Febrero y Marzo del 2008 al 2011 principalmente, se presenta la variante con la retención

del intrón B, corroborando la existencia de una regulación diferencial entre las gónadas y el cerebro anterior.

En esta especie, un estudio previo a nuestro trabajo, ha localizado a través de la técnica de Inmunohistoquímica, el péptido de la isoforma sGnRH en las gónadas que se encontraban en etapa de madurez sexual, sugiriendo que dicho péptido puede tener repercusiones en la gametogénesis durante el ciclo reproductivo. Posteriormente se tendrá que investigar cual es la función de esta isoforma en las gónadas y si esta varía a través de los meses.

En los mamíferos, en el cerebro de ratas se sabe que el primer intrón que es escindido es el intrón B, seguido del intrón C y A (Jakubowsky & Roberts, 1994).

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que los intrones B y C se remueven más rápidamente que el intrón A (Seong et al., 1999)

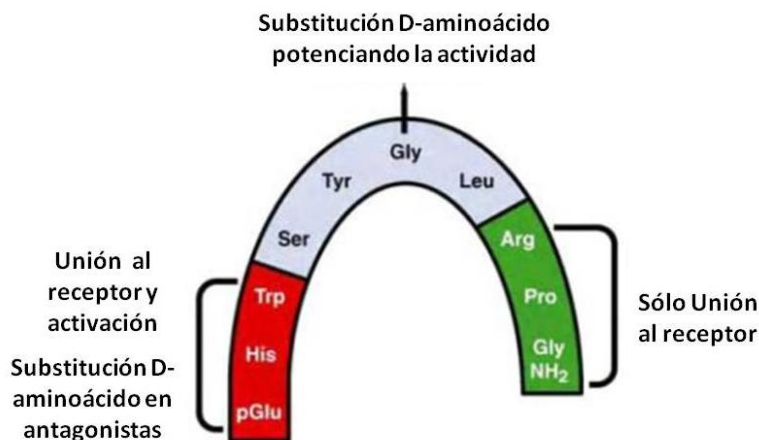
En *Chirostoma humboldtianum*, no se sabe cuál es la función del intrón B, además, la presencia del transcrito con la retención del Intrón B, no sólo se presenta en la isoforma pjGnRH, sino también en la isoforma sGnRH (Chávez *et al.*, 2011, *Frontiers of Endocrinology*, aceptado). Sin embargo, con los estudios antes descritos, se puede proponer que es un mecanismo de regulación en la transcripción de dichas isoformas.

En cuanto a las posibles funciones del GAP, han sido estudiadas, por tal motivo hasta la fecha no se ha definido alguna función en concreto.

En estudios *in vitro*, utilizando como modelo las células GH3, se registró que el GAP inhibe la secreción de prolactina GH<sub>3</sub> (Nikolics et al, 1985; Van Choui *et al.*, 1993). En tilapia se han obtenido resultados similares (Planas *et al.*, 1990).

Se sabe que la secuencia del GAP de las diferentes isoformas reportadas para la GnRH, es la más divergente, y se ha ido cambiando con la evolución de los precursores (Suzuki *et al.*, 2000). Esta diferencia tan marcada ha sido de gran importancia ya que se ha usado para la elaboración de ribosondas y anticuerpos más específicos usados en técnicas como Inmunohistoquímica e Hibridación *in situ*, que han servido para una mejor identificación de la distribución de las diferentes isoformas presentes en el encéfalo.

De manera general, después del procesamiento de la GnRH, la conservación en la estructura primaria de los residuos de aminoácidos en la secuencia de las GnRHs, como es el amino-terminal (pGlu), la serina 4, la glicina en la posición 6, para el caso de los vertebrados, la prolina y el carboxilo terminal, sugiere que estas regiones son importantes para la bioactividad y conformación del péptido, particularmente, con la unión y activación efectiva con el receptor, la resistencia a la degradación enzimática y los eventos que son necesarios para la liberación de las gonadotropinas. Los aminoácidos que se encuentran en posición 8, es la más variada, seguida de la posición 6, 5 y 7. En el caso de la posición 8, sugiere que cualquier residuo es aceptado en esta región. (Millar, 2004, 2005). (Figura 21 y 26) Sin embargo, para el caso del receptor Tipo I en la hipófisis del ratón, parece que requiere de una Arginina en esta posición, lo que sugiere que esta posición tiene un papel importante en la selectividad del ligando de los diferentes tipos de receptores para GnRH (Sealfon, 1997).



**Figura 26.** Se muestra el esquema representativo de GnRH en conformación plegada, el cual sirve para la unión del receptor en la hipófisis. Esta molécula se dobla alrededor de la glicina en la posición 6. En color rojo se muestra el extremo amino terminal y en verde el carboxilo terminal (Modificado de Millar, 2005).

## 9. CONCLUSIONES:

Se ha aislado por primera vez la isoforma de pjGnRH en el charal (*Chirostoma humboldtianum*), se obtuvieron productos de 400, 300 y 100pb, a través de la técnica de PCR. Dicha secuencia abarca, el decapeptido de GnRH, el sitio de procesamiento y el péptido asociado a GnRH (GAP), que es conservada en los vertebrados.

Además, dentro de la secuencia obtenida, se presenta evidencia de la retención del intrón B, que ha sido reportada en varios vertebrados incluidos ratones y algunos peces.

Esta hormona se presenta durante los meses de Enero a Mayo, que corresponde a la etapa de madurez sexual del charal, reforzando la idea de que GnRH ayuda a la síntesis y liberación de las gonadotropinas.

## 10. PERSPECTIVAS:

A partir de la obtención de la secuencia parcial de la isoforma pjGnRH, se sugieren diferentes experimentos que podrían a futuro entender la fisiología, mecanismos de acción y función de esta neurohormona.

- En el área de estudio:

Tratar de separar los organismos obtenidos en cada colecta por talla, sexo y etapa reproductiva. Para si entender mejor la fisiología de cada uno de los individuos y etapas, para su posterior aplicación de los conocimientos adquiridos.

Hacer un rastreo de los organismos, la mayor parte de los meses de colecta

- En el laboratorio:

Uno de los experimentos que se requieren es obtener la secuencia total con la técnica de RACE y obtener la secuencia sin la secuencia intrónica reportada en este trabajo.

Saber si existen diferencias ambos sexos en cuanto a la concentración y distribución en los distintos meses del año.

Correlacionarlas con los otros dos sistemas de la GnRH presentes en el encéfalo de esta especie (sGnRH y cGnRH-II), con técnicas como la Inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

Establecer la relación con otras hormonas y sus receptores como: GnRH-R, Kisspeptina, GPR54, LH, FSH, PACAP, GH, receptores a estradiol, por mencionar algunos, que estén participando de manera directa o indirecta regulando la síntesis y liberación de la pjGnRH.

Tratar de obtener organismos en el laboratorio, para así poder implementar otra serie de experimentos más controlados.

## 11. REFERENCIAS

Aerle R., Kille P., Lange A. & Tyler C. 2007. Evidence for the existence of a functional Kiss/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides*. Vol.29:57-64.

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

Adams, B., Tello, J., Erchegeyi, J., Warby, C., Hong, D., Akinsanya, K., Mackie, G., Vale, W., Rivier, J. & Sherwood, N. 2003. Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinol*. 144: 1907-1919.

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

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

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

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

Anctil, M. 2001. Evidence de gonadotropin-releasing hormone-like peptides cnidarian nervous system. *Gen Com Endocrinol*. 119: 317-328.



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

Bentley GE, Perfito N, Ukena K, Tsutsui K, Wingfield JC. 2003. Gonadotropin-inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken-gonadotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol.* Vol. 15(8):794-802.

Blancas, G. A., Figueroa, I. Barriga S. y Arredondo J. L., 2003. Aportaciones al cultivo del pez blanco *Chirostoma humboldtianum* (Pisces:Atherinopsidae), En: Historia y avances del cultivo de pescado blanco, *Instituto Nacional de la Pesca*, 155-168 pp.

Bliss S, Navratil A, Xie J & Roberson M. 2010. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol.* Vol.31 (3):322-340.

Bogerd, J., Zandbergen, M., Andersson, E., Goos, H., Th. 1994. Isolation, characterization and expression of cDNAs encoding the catfish-type and chicken-II-type gonadotropin-releasing hormone precursors in the African catfish. *Eur J Biochem.* 222:541-549.

Burmeister S, Jarvis E & Fernald R. 2005. Rapid behavioral and genomic responses to social opportunity. *PLOS Biol.* Vol.3 (11):1996-2004.

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

Castaño P., Martínez-Fuentes J., Gutiérrez-Pascual E., Vaudry H., Tena-Sempere M. & Malagón M. 2009. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: Do multiple signals underlie function diversity? *Peptides.* Vol. 30: 10-15.

Castellano JM., Navarro VM., Fernández-Fernández R., Nogueiras R., Tovar S. & Roa J. 2005. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinol.* 146:3917-3925.

Chávez M. 2009. Distribución de la hormona liberadora de gonadotropinas de salmón (sGnRH) en el cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Tesis de Maestría.

Choe Y, Son GH, Lee S, Park E, Moon Y, Kim K. 2003. Cell differentiation of gonadotropin-releasing hormone neurons and alternative RNA splicing of the gonadotropin-releasing hormone transcript. *Neuroendocrinol.* Vol.77(4):282-90.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* Vol. 162(1):156-9.

Clarke IJ, Pompolo S. 2005. Synthesis and secretion of GnRH. *Anim Reprod Sci.* Vol. 88(1-2):29-55.

Collins P., O'Neill P., Barron B., Moore R. & Sherwood N. 2001. Gonadotropin-releasing hormone content in the brain and pituitary of male and female grass rockfish (*Sebastes rastrelliger*) in relation to seasonal changes in reproductive status. *Biol Reprod.* 65: 173-175.

Dedes I. 2012. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion. *Systems Biol Reprod Med.* 1-8.

De la Cruz, G. & E. Moncayo. 1985. Análisis de la variabilidad en una población del charal *Chirostoma humboldtianum* Valenciennes (Atherinidae) del embalse Huapango, Méx. VIII *Congr. Nal. Zool.* (Memorias) Saltillo, 1:29-40.

de Roux N., Genin E., Carel JC., Matsuda F., Chaussain JL. & Milgrom E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA.* Vol.100:10972-10976

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

Dong KW, Duval P, Zeng Z, Gordon K, Williams RF, Hodgen GD, Jones G, Kerdelhue B, Roberts JL. 1996. Multiple transcription start sites for the GnRH gene in rhesus and cynomolgus monkeys: a non-human primate model for studying GnRH gene regulation. *Mol Cell Endocrinol*. Vol.25; 117(2):121-30.

Dong KW, Yu KL. & Roberts JL. 1993. Identification of a major up-stream transcription start site for the human progonadotropin-releasing hormone gene used in reproductive tissues and cell lines. *Mol Endocrinol*. Vol.7(12):1654-66.

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

Fernández E. Navarrete N. Robles JL. 2008. Alimentación de *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes); (Pisces: atherinopsidae) en el estanque JC en Soyaniquilpan, Estado de México. *Revista Chapingo*. Vol 14 (2):129-134.

García A & Lagunes A. 2010. Aislamiento parcial y secuenciación del receptor acoplado a proteínas G 54 (GPR54) en el encéfalo de *Chirostoma humboldtianum*. Tesis de Licenciatura.

Garibay, R., E. Uria, & E. Moncayo. 1988. Estudio histológico de las gónadas del charal *Chirostoma humboldtianum* Valenciennes (Atherinidae) del embalse Huapango, Méx. I *Cong. Nal. Ict.* Sociedad Ictiológica Mexicana A.C. Baja California, México. 112.

González A. 2010. Distribución del Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria (PACAP) en gónadas de *Chirostoma humboldtianum*. Tesis de Licenciatura. FES-I

González, J.L. 2002. Descripción de la estructura y la ultraestructura del ovario *Chirostoma humboldtianun* (VALENCIENNES 1835). Tesis de Licenciatura. FES-I. Pp.1-3.

González-Martínez D., Madigou T., Zmora N., Anglade I., Zanuy S., Zohar Y., Elizur A., Muñoz-Cueto JA. & Kah O. 2001. Differential expression of three different prepo-GnRH

(gonadotropin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Comp Neurol*. Vol.429: 144-155.

Gothilf Y., Meiri I., Elizur A. & Zohar Y.1997. Preovulatory changes in the levels of three gonadotropin-releasing hormone-encoding messenger ribonucleic acids (mRNAs), gonadotropin  $\beta$ -subunit mRNAs, plasma gonadotropin and steroids in the female gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Biol Reprod*. Vol.57: 1145-1154.

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

Guilgur LG, Miranda, L. & Somoza, G. 2003. Characterization of three GnRH cDNA sequences in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiol Biochem*. 28: 39-40.

Guilgur LG, Moncaut NP, Canário AV, Somoza GM. 2006. Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. Vol. 144(3):272-83.

Guilgur LG., Ortí G., Strobl-Mazzulla P., Fernandino J., Miranda L. & Somoza G. 2007. Characterization of the cDNAs encoding three GnRH forms in the Pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes) and the evolution of GnRH precursors. *J Mol Evol*. Vol.64: 614-627.

Guilgur LG., Strüssman C. & Somoza G. 2009. mRNA expression of GnRH variants and receptors in the brain, pituitary and ovaries of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in relation to the reproductive status. *Fish Physiol Biochem*.

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

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

Hofmann H. 2006. Gonadotropin-releasing hormone signaling in behavioral plasticity. *Curr Op Neurobiol.* Vol. 16:1-8.

Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. 2004 Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinol.* Vol. 80:264–72.

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.* Vol. 291: 1187-1193.

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

Kakizawa S., Kaneto T. & Hirano T. 1999. Effects of hypothalamic factors on somatolactin secretion from the organ-cultured pituitary of rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol.* Vol.105 (1): 71-78.

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

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

Kotani M., Detheux M., Vandenberghe A., Communi D., Vanderwinden JM. & Le Poul E. 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*. 276:34631-34636.

Kuo M, Lou S, Postlethwait J, Chung C. 2005. Chromosomal organization, evolutionary relationship, and expression of zebrafish GnRH family members. *J Biomed Sci*. Vol. 12(4):629-39.

Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E. 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*. 88:1731-1737.

Lee Y., Tsunekawa K., Moon M., Um H., Hwang J., Osugi T., Otaki N., Sunakawa O., Kim S., Vaudry H., Kwon H., Seong J & Tsitsui K. 2009. Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Neuroendocrinol*. Vol. 150 (6): 2837-2846.

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

Lovane A, Aumas C, de Roux N. 2004. New insights in the genetics of isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol*. Vol.151 Suppl 3:U83-8.

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

Martínez CA, Racotta IS, Ríos-Durán MG, Palacios E, Toledo-Cuevas & Ross LG. 2006. Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). *Biocell*. Vol 30 (1): 137-148.

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

Marchant TA, Chang JP, Nahorniak CS, Peter RE. 1989. Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinol*. Vol. 124(5):2509-18.

Mares, G. & Morales, J. J. 2003. Contribución al estudio del cultivo de pescado blanco *Chirostoma estor estor* en el Centro Regional de Investigación Pesquera de Pátzcuaro, Michoacán, En: Historia y avances del cultivo de pescado blanco, *Instituto Nacional de la Pesca*, 143-153 pp.

Maruska K, Levavi-Sivan B, Biran J & Fernald. 2011. Plasticity of the reproductive axis caused by social status change in an african cichlid fish: I. Pituitary gonadotropins *Endocrinol*. Vol 152 (1):281-290)

Matsui H., Takatsu Y., Kumano S., Matsumoto H. & Ohtaki T. 2004. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol.320:383-388.

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

Messenger S., Chatzidaki EE., Ma D., Hendrick AG., Zahn D. & Dixon J. 2005b. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 102:1761-1766.

Mikkelsen J. & Simonneaux V. 2008. The neuroanatomy of kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides*. Vol.30(1):26-33.

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

Millar R, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. 2004. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinol Rev.* Vol. 25(2):235-75.

Millar RP, Pawson AJ, Morgan K, Rissman EF, Lu ZL. 2008. Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol.* Vol. 29(1):17-35.

Miller, R. 1986. Composition and derivation of the freshwater fish fauna of México. *An. Esc. Nac. Cienc. Biol.* 30: 121-155 p.

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

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

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

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

Nabissi M, Soverchia L, Polzonetti-Magni AM, Habibi HR. 2000. Differential splicing of three gonadotropin-releasing hormone transcripts in the ovary of seabream (*Sparus aurata*). *Biol Reprod.* Vol. 62(5):1329-34.



Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J. & Mayen A. 2005a. Characterization of the Potent LH Releasing Activity of KiSS-1 peptide, the Natural Ligand of GPR54. *Endocrinol.* 146:156-163.

Navarro VM., Castellano JM., Fernández-Fernández R., Tovar, S., Roa J., Mayen A. 2005b. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinol.* 146:1689-1697.

Navarro VM., Fernández-Fernández R., Castellano JM., Roa J., Mayen A. & Barreiro ML. 2004b. Advanced Vaginal Opening and Precocious Activation of the Reproductive Axis by KiSS-1 Peptide, the Endogenous Ligand of GPR54. *J Physiol.* Vol. 561:379-386

Nelson, Joseph S. (2006). *Peces del Mundo*. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-25031-7.

Nikolics K, Mason AJ, Szönyi E, Ramachandran J, Seeburg PH. 1985. A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. *Nature.* Vol. 8-14; 316(6028):511-7.

Ohkubo M., Aranishi, F. & Shimizu A. 2010. Molecular cloning and brain distribution of three types Gonadotropin-releasing hormone from mummichog *fundulus heteroclitus*. *J Fish Biol.* Vol. 76: 379-394.

Ohtaki T., Shintani Y., Honda S., Matsumoto H., Hori A., Kanehashi K., Terao Y., Kumano S., Takatsu Y., Masuda Y., Ishibashi Y., Watanabe T., Asada M., Yamada T., Suenaga M., Kitada, C., Usuki S., Kurokawa T., Onda H., Nishimura O. & Fujino M. 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature.* 411:613-617.

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.* Vol.276: 298-303.

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

Mori A, Gen K, Yamaguchi S, Kagawa H. 2002. Regulation of GnRH and its receptor in a teleost, red seabream. *Prog Brain Res*. Vol. 141:95-110.

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

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

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

Osugi T, Ukena K, Bentley GE, O'Brien S, Moore IT, Wingfield JC, Tsutsui K. 2004. Gonadotropin-inhibitory hormone in Gambel's white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*): cDNA identification, transcript localization and functional effects in laboratory and field experiments. *J Endocrinol*. Vol.182 (1):33-42.

Pandolfi M, Muñoz Cueto JA, Lo Nostro FL, Downs JL, Paz DA, Maggese MC, Urbanski HF. 2005. GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae) revisited: a localization study with antibodies and riboprobes to GnRH-associated peptides. *Cell Tissue Res*. Vol. 321(2):219-32.

Pawson AJ. & McNeilly AS. 2005. The pituitary effects of GnRH. *Anim. Reprod. Sci*. 88: 75-94.

Planas J, Bern HA, Millar RP. 1990. Effects of GnRH-associated peptide and its component peptides on prolactin secretion from the tilapia pituitary in vitro. *Gen Comp Endocrinol*. Vol. 77(3):386-96.

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

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

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

Radovick S, Wondisford FE, Nakayama Y, Yamada M, Cutler GB Jr, Weintraub BD. 1990. Isolation and characterization of the human gonadotropin-releasing hormone gene in the hypothalamus and placenta. *Mol Endocrinol.* Vol. 4(3):476-80.

Rangaraju N, Xu J. & Harris R. 1991. Pro-gonadotropin-releasing hormone protein is processed within hypothalamic neurosecretory granules. *Neuroendocrinol.* Vol.53: 20-28.

Roa J, Tena-Sempere M. 2007. KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen Comp Endocrinol.* Vol. 153(1-3):132-40.

Rojas P. 2005. El pescado blanco. Revista Digital Universitaria. Vol. 6 (8):2-18.

Rosas M. 1976. Datos biológicos de la ictiofauna del lago de Pátzcuaro con especial énfasis en la alimentación de sus especies, Mem. Simp. Pesq. Ag Cont. Tuxtla Gutierrez, Chis., 299-366 pp.

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

Seminara SB. 2005. We all remember our first kiss: kisspeptin and the male gonadal axis. *J Clin Endocrinol Metab.* Vol.90(12):6738-40.

Seminara SB. 2006. Mechanisms of Disease: the first kiss-a crucial role for kisspeptin-1 and its receptor, G-protein-coupled receptor 54, in puberty and reproduction. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* Vol. 2(6):328-34.

Schulz RW & Miura T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem.* 26: 43-56.

Seeburg PH, Adelman JP. 1984. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature.* Vol.18-24;311(5987):666-8.

Seong JY, Park S, Kim K. 1999. Enhanced splicing of the first intron from the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) primary transcript is a prerequisite for mature GnRH messenger RNA: presence of GnRH neuron-specific splicing factors. *Mol Endocrinol.* Vol. 13(11):1882-95.

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

Shahab M., Mastronardi C., Seminara SB., Crowley WF., Ojeda SR. & Plant TM. 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* Vol.102:2129-2134.

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

Smith J.T., Cunningham M.J., Rissman EF., Clifton DK. & Steiner RA. 2005a. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinol.* Vol. 146: 3686-3692.

Smith JT., Dungan H.M., Stoll EA., Gottsch ML., Braun RE., Eacker SM., Clifton DK. & Steiner RA. 2005b. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinol.* Vol. 146:2976-2984.

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

Somoza G., Miranda L., Guilgur L. & Strobl-Mazzulla P. 2006. Characterization of the brain- pituitary axis in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. 2006. *Bio Cell.* 30(1): 89-95.

Sower, S., Chiang, Y., Lovas. S. & Conlon J. 1993. Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinol.* 132(3):1125-31

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

Stefano A, Vissio P, Paz D, Somoza G, Maggese M, Barrantes G. 1999. Colocalization of GnRH binding sites with gonadotropin-, somatotropin-, somatolactin-, and prolactin-expressing pituitary cells of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, in vitro. *Gen Comp Endocrinol.* Vol. 116(1):133-9.

Suzuki K, Gamble RL, Sower SA. 2000. Multiple transcripts encoding lamprey gonadotropin-releasing hormone-I precursors. *J Mol Endocrinol.* Vol. 24(3):365-76.

Tena-Sempere M. 2006. KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility. *Neuroendocrinol.* Vol.83(5-6):275-81

Toribio, LM. 2010. Distribución de la isoforma de salmón de GnRH (sGnRH) en gónadas de *Chirostoma humboldtianum*. Tesis de Licenciatura.

Thompson EL., Patterson M., Murphy KG., Smith KL., Dhillon WS., Todd JF., Ghatei MA. & Bloom SR. 2004. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol.* 16:850-858.

Tsai PS, Zhang L. 2008. The emergence and loss of gonadotropin-releasing hormone in protostomes: orthology, phylogeny, structure, and function. *Biol Reprod.* Vol.79(5):798-805.

Tsutsui K. 2009. A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Prog Neurobiol.* Vol.88(1):76-88.

Tsutsui K. 2010. Phylogenetic aspects of gonadotropin-inhibitory hormone and its homologs in vertebrates. *Ann N Y Acad Sci.* Vol.1200:75-84.

Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun.* Vol.28;275(2):661-7.

Ubuka T, McGuire NL, Calisi RM, Perfito N, Bentley GE. 2008. The control of reproductive physiology and behavior by gonadotropin-inhibitory hormone. *Integr Comp Biol.* Vol. 48(5):560-9.

Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K. 2003. Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain. *Cell Tissue Res.* Vol. 312(1):73-9.

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

Uzbekova S, Lareyre JJ, Madigou T, Davail B, Jalabert B, Breton B. 2002. Expression of prepro-GnRH and GnRH receptor messengers in rainbow trout ovary depends on the stage of ovarian follicular development. *Mol Reprod Dev.* Vol. 62(1):47-56.

Van Chuoi, Vancher P. & Dufy B.1993. GnRH-associated peptide decreases cyclic AMP accumulation in the GH3 pituitary cell line. *Endocrinol.* Vol. 58(2): 251-257.

Vickers ED, Laberge F, Adams BA, Hara TJ, Sherwood NM. 2004. Cloning and localization of three forms of gonadotropin-releasing hormone, including the novel whitefish form, in a salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biol Reprod.* Vol.70(4):1136-46.

Villacaña F. 1999. Cultivo experimental de pescado blanco (*Chirostoma promelas*) en estanquería rústica”, En: Instituto Nacional de la Pesca (Ed.), IV Reunión Nacional de Redes de Investigación en Acuicultura, Cuernavaca, Mor., 19-21 135-137 pp.

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

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

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

Wetsel WC, Mellon PL, Weiner RI, Negro-Vilar A.1991. Metabolism of pro-luteinizing hormone-releasing hormone in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinol.* Vol.129 (3):1584-95.

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

Zhang L., Wayne, N., Sherwood, N., Postigo, H. & Tsai, P. 2000. Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an opisthobranch mollusk, *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol.* **118 (1): 77-89.**

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

Zohar Y., Muñoz-Cueto JA, Elizur A. & Kah O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen Comp Enocrinol.* Vol.165: 438-455.