



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Colocalización de la Hormona del Crecimiento (GH) y del Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa (PACAP) en hipófisis de *Chirostoma humboldtianum* durante el ciclo sexual de machos y hembras.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

María Violeta Juárez Robles

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

COMITÉ TUTOR: Dra. Juana Alba Luis Díaz

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Posgrado en Ciencias Biológicas

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, ENERO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Colocalización de la Hormona del Crecimiento (GH) y del Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa (PACAP) en hipófisis de *Chirostoma humboldtianum* durante el ciclo sexual de machos y hembras.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

María Violeta Juárez Robles

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

COMITÉ TUTOR: Dra. Juana Alba Luis Díaz

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Universidad Nacional Autónoma de México

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, ENERO, 202

OFICIO CPCB/1088/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de julio de 2019, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **JUAREZ ROBLES MARIA VIOLETA**, con número de cuenta 306123874, con la tesis titulada "**Colocalización de la hormona del crecimiento (GH) y del polipéptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) en hipófisis de *Chirostoma humboldtianum* durante el ciclo sexual de machos y hembras.**". realizada bajo la dirección del **DR. RODOLFO CARDENAS REYGADAS**:

Presidente: DR. JUAN MANUEL ARIAS MONTAÑO
Vocal: DRA. MARIA ESTHER CRUZ BELTRAN
Secretario: DRA. JUANA ALBA LUIS DIAZ
Suplente: DRA. MARIA ELENA AYALA ESCOBAR
Suplente: DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 9 de octubre de 2019.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



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

Agradecimientos

Al posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM, por aceptarme y brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), le agradezco el apoyo brindado mediante la beca otorgada en el transcurso de mis estudios. No. de becario 584226.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García y la Dra. Juana Del Alba Luis Díaz, por ser miembros del comité tutor.

Agradecimientos a título personal

Al Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas, por darme su apoyo en cada paso del camino, a pesar de las múltiples complicaciones que experimenté, gracias por la confianza y por no rendirse, eso me dio el valor de seguir, sobre todo gracias por el conocimiento que compartió conmigo a lo largo de estos 10 años. Gracias por todo este tiempo.

A la M. en C. Beatriz Macedo Garzón, por tus revisiones y sugerencias, por los consejos, ayuda y por la persona que formaste en mí, gracias.

A la M. en C. Mónica Chávez Maldonado, gracias por tu apoyo en lo académico y en lo personal, fuiste un soporte en los momentos difíciles.

A mis padres, gracias a ambos por guiarme y acompañarme en el camino.

A mi hermana, Lili, gracias hermana por ser una luz en mi camino, y en ocasiones, por los regaños que me permitieron concluir este proceso.

A mi esposo, te agradezco que seas un hombre del que pueda fiarme en momentos difíciles.

Dedicatoria:

A mis padres:

A ustedes que han estado conmigo, quiero darles las gracias, por no abandonarme frente a ninguna circunstancia, gracias por ser el soporte que necesita mi vida, por ser mi guía y mi refugio, espero ser un día una persona con los mismos valores y actitud que ustedes tienen y vivir con la energía y alegría con la que enfrentan lo bueno y lo malo. Este triunfo es más suyo que mío, disfrútenlo.

A mi hermana:

A ti hermanita, quiero agradecerte por las conversaciones y los consejos que hemos tenido hasta horas avanzadas de la noche. Gracias por las salidas a comer o paseos que han servido en más de una ocasión para despejar mi mente, regresar la sonrisa a mi rostro y la calidez a mi corazón.

A mi esposo:

Gracias amor, por compartir tu vida conmigo y por aportar tranquilidad y sensatez a mi día a día, sé que las cosas no han sido fáciles sobre todo durante los exámenes, gracias por apoyarme en los estudios y cuidar de las niñas cuando yo no he podido, gracias por darme el valor de iniciar este camino que a ti y a mí nos ha costado tanto, te amo.

A mis hijas:

Ustedes dos son la razón principal de este proyecto, son el motivo primordial de seguir adelante a pesar de todo, si el día es horrible y parece falto de ilusiones ustedes regresan el color y las ganas de continuar. Se que en ocasiones no recibieron de mi la atención necesaria, espero compensar eso. Las amo con todo mi corazón.

Índice:	
Resumen	1
Abstract	2
1.-Introducción	3
1.1. Hormona del crecimiento	5
1.2. Aspectos generales	5
1.3. Distribución de GH en teleósteos	7
1.4. Estructura del gen de GH	10
1.5. Receptor a GH	11
1.6. Polipéptido activador de la adenilato ciclasa	13
1.7. Aspectos generales	13
1.8. Distribución	14
1.9 Receptor a PACAP	15
2. Antecedentes	17
2.1 Relación entre PACAP y GH	17
3. Modelo de estudio	18
4. Justificación	19
5. Objetivos	20
6. Materiales y métodos	21
6.1. Trabajo de campo	21
6.2. Trabajo de laboratorio	22
6.3. Revisión del estado gonádico	22
6.4 Inmunohistoquímica	23
6.5 Determinación del número de fibras PACAP	25
7. Resultados	26
8. Discusión	38
9. Conclusión	41
10. Referencias	42

Resumen

La hormona del crecimiento (GH) es una hormona hipofisiaria multifactorial que regula procesos tan diversos como el crecimiento somático y la reproducción. Se conocen muchas hormonas que regulan positiva o negativamente a GH, entre los reguladores positivos encontramos al polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), mientras que su principal regulador negativo es la somatostatina (SS). En los teleósteos, la GH se distribuye principalmente en la *pars distalis proximalis* (PPD) y la *pars intermedia* (PI) de la hipófisis de algunas especies. El PACAP es un neuropéptido capaz de incrementar la liberación de cAMP provocando liberación de diversas hormonas, entre ellas la GH. El PACAP se distribuye desde la corteza cerebelar hasta órganos como estómago y gónadas. En el presente trabajo el modelo de estudio fue *Chirostoma humboldtianum*, un pez de agua dulce (mejor conocido como pez blanco), que actualmente presenta una distribución muy restringida en la cuenca Lerma-Santiago, siendo la laguna de Zacapu, Michoacán uno de sus hábitats más importantes. El objetivo de este estudio fue determinar si el PACAP se encuentra en las proximidades de las células somatotropas de la hipófisis durante diferentes etapas del ciclo sexual. Para determinar la colocalización de ambas sustancias se obtuvieron muestras de cerebro del pez en estudio, las cuales fueron procesadas mediante la técnica histológica de rutina. Posteriormente, se realizó la técnica inmunohistoquímica con los anticuerpos contra GH y PACAP. Pudimos observar células somatotropas que se asocian con las fibras PACAP que inervan la adenohipófisis. Se hizo un conteo de células reactivas a GH encontrando fibras nerviosas inmunorreactivas a PACAP muy cerca de células somatotropas; el número de células inmunorreactivas varió de un mes a otro del ciclo sexual. Es la primera vez que se reporta la relación que existe entre PACAP y GH en la hipófisis de *C. humboldtianum* o alguna otra especie de Atherinimorfo, extendiendo los hallazgos de que el PACAP también participa de manera directa en la regulación de la secreción de GH en este importante grupo de peces.

Abstract

Growth hormone (GH) is a multifactorial pituitary hormone that regulates processes as diverse as somatic growth and reproduction. Many hormones are known for regulating either positively or negatively the GH. Among the positive regulators we find the polypeptide activator of adenylate cyclase (PACAP), while its main negative regulator is somatostatin (SS). In teleost, GH is distributed mainly in the *pars distalis proximalis* (PPD) and the *pars intermedia* (PI) of the pituitary gland of some species. PACAP is a neuropeptide capable of increasing the release of cAMP causing the release of various hormones, including the GH. PACAP is distributed from the cerebellar cortex to organs such as the stomach and gonads. In this work the study model was the *Chirostoma humboldtianum*, a freshwater fish that currently has a very restricted distribution in the Lerma-Santiago basin, being the lagoon of Zacapu, Michoacán. The objective of this study was to determine if PACAP is found in the proximities of somatotropic pituitary cells at different stages of the sexual cycle. In order to determine their proximity of both substances, brain samples were obtained from the fish under study, which were processed using routine histological technique. Subsequently, immunohistochemistry was performed with antibodies to GH and PACAP. We were able to observe somatotropic cells associated with PACAP fibers that innervate the adeno-hypophysis. A count of reactive cells to GH was made finding immunoreactive nerve fibers to PACAP very close to somatotropic cells, the number of immunoreactive cells varied from month to month of the sexual cycle. This is the first time that the relationship between PACAP and GH has been reported in the pituitary gland of *C. humboldtianum* or another species of Atherinymorph, extending the findings that PACAP also participates directly in the regulation of GH secretion in this important group of fishes.

1. Introducción

El estudio del sistema endócrino de los seres vivos es fundamental para conocer la manera en que las hormonas interaccionan e intervienen en los procesos de crecimiento, reproducción, metabolismo, y en general, en su fisiología.

Una de las aplicaciones que se le ha dado a la información obtenida en el estudio de las vías hormonales, ha sido en la producción animal, en la cual generalmente se enfocan en potenciar la talla que pueden alcanzar los animales en el menor tiempo posible acelerando así la reproducción. En la acuicultura se ha implementado para los mismos fines, ya que, conociendo los factores que regulan el desarrollo de los peces, podemos lograr que éstos alcancen una mayor talla comercial y generar una producción más eficiente. Estos estudios pueden beneficiar en gran medida la producción de especies cuya población se ha visto reducida debido a diferentes factores tales como la contaminación o disminución de sus hábitats, así como por el desplazamiento por especies introducidas, este es el caso de *Chirostoma humboldtianum*, mejor conocido como pez blanco del altiplano o charal grande.

La Hormona del Crecimiento (GH) ha sido estudiada ampliamente por su potencial uso como acelerador del crecimiento y regulador de la reproducción. Se ha demostrado que, a pesar de que el crecimiento es la función más conocida de la GH, esta hormona cumple con funciones muy variadas; entre ellas encontramos la regulación del desarrollo ontogénico, del metabolismo, la osmolaridad, la reproducción o funciones tan inesperadas como la inmunidad (Björnsson, 1997; Canosa *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2011; Lugo *et al.*, 2010).

La regulación de la secreción de la GH en peces difiere significativamente de otros vertebrados debido a la organización que posee el eje hipotálamo-hipófisis en los teleósteos ya que en este grupo no existe un sistema porta-hipofisiario y las neurohormonas son liberadas de manera directa en las inmediaciones de las células de la adenohipófisis, a través de las prolongaciones de las neuronas secretoras, por si esto fuera poco se tiene muy claro que la GH en estos vertebrados presenta una

regulación multifactorial (revisado entre otros por: Canosa *et al.*, 2007; Gahete *et al.*, 2009).

Recientemente, se ha confirmado la importancia de PACAP en la regulación positiva de GH en los mamíferos como en otros grupos de vertebrados incluidos los teleósteos (Wong *et al.*, 2005; Sze *et al.*, 2007; Grey y Chang., 2013)

En estos últimos, se sabe que entre los principales reguladores de la secreción de la GH se encuentra el PACAP, una neurohormona hipotalámica de 38 aminoácidos cuya principal acción es incrementar los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). Se ha puntualizado que este péptido puede ser considerado en los teleósteos, el equivalente a lo que es la hormona liberadora de la hormona de crecimiento en los mamíferos (GHRH) (Wong *et al.*, 2005); se conoce también que el PACAP participa en la regulación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Winters and Moore, 2010) y que puede estimular la secreción de prolactina (PRL) y somatolactina (SL) (Vaudry *et al.*, 2009); diversos estudios comprueban su efectividad en dicho sistema (Wong *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 2005)

Recientemente, se ha confirmado la importancia del PACAP en la regulación positiva de la GH, tanto en los mamíferos, como en otros grupos de vertebrados, incluidos teleósteos (Peng y Peter, 1997; Wong *et al.*, 1998; Ji *et al.*, 2011).

Se ha reportado que en *Cynoglossus semilaevis*. existen diferencias en la efectividad estimuladora del PACAP sobre la GH dependiendo el sexo y la edad del organismo (Ji *et al.*, 2011). Para ciprínidos y tilapias se reporta que el PACAP es más efectivo en estimular la secreción de la GH durante el periodo de regresión del ciclo sexual (Peng y Peter, 1997; Melamed *et al.*, 1998).

En el presente trabajo establecemos la relación que existe entre la GH y el PACAP en *C. humboldtianum*, de lo cual se tienen antecedentes en peces relacionados con la familia Atherinopsidae.

1.1 Hormona del crecimiento (GH)

1.2 Aspectos generales

La GH fue aislada por primera vez a partir de la hipófisis bovina (Li *et al.*, 1945). Este polipéptido de cadena simple ha sido estudiado en muchas especies de vertebrados, pues es esencial para el crecimiento somático normal de cualquier organismo; para agregarle valor a su estudio debemos recordar que la GH pertenece a una clase de hormonas que se han conservado evolutivamente entre los vertebrados. La GH es una hormona monomérica que está formada por 190 aminoácidos cuya masa oscila entre 21 - 23 KDa, presenta dos enlaces disulfuro que al parecer tienen una función importante para su unión al receptor (Canosa *et al.*, 2007; Waters *et al.*, 1999). En los mamíferos se encuentran incluidas en el grupo de hormonas en el que se encuentra la GH, la prolactina y el lactógeno placentario (Roby *et al.*, 1993), mientras que en teleósteos la GH, junto con la prolactina (PRL) y la somatolactina (SL) se incluyen en el grupo de hormonas peptídicas de la hipófisis (Hernández-Cervantes *et al.*, 2010).

La GH es sintetizada con un péptido señal en la región amino terminal; este péptido señal es removido cuando se la hormona se internaliza en el retículo endoplásmico. En peces óseos como en otros vertebrados, las células responsables de sintetizar la GH son las células somatotropas, las cuales se encuentran en la adenohipófisis, y en varios teleósteos presentan un arreglo muy particular cerca de la neurohipófisis, pero separada de ella por una membrana basal (Villaplana *et al.*, 2003).

Además del crecimiento somático la GH participa muy estrechamente en otras funciones como la nutrición, la osmolaridad y en algunos procesos de inmunidad (Canosa *et al.*, 2007) estimulando la actividad citotóxica no específica en leucocitos (Calduch-Guiner *et al.*, 1997) y, además se sabe perfectamente que tiene un papel importante en la reproducción (Hull and Harvey, 2001).

Como ya se mencionó, la GH tiene una regulación multifactorial. Uno de los elementos que la regulan es el estradiol (E₂), para el que se sabe existe un elemento de respuesta a estradiol (ERE) en las regiones promotoras de los genes de la GH

de algunas especies de teleósteos, como es el caso de 8 especies del género *Salvelinus* (Pankova *et al.*, 2013). El E₂ aumenta el contenido de la GH madura en la hipófisis del pez dorado. El contenido de la GH en el suero estimula la síntesis de la GH a nivel transcripcional o postranscripcional de manera *in vitro* (Zhou *et al.*, 2004). En la tilapia el E₂ actúa a nivel de la hipófisis potenciando la liberación de la GH (Melamed *et al.*, 1995).

Existe un elemento de respuesta a hormonas tiroideas en los genes de GH de los vertebrados, por lo cual, éstas estimulan directamente la tasa de transcripción dirigiendo la acumulación de mRNA de la GH e incrementando la producción de la GH madura (Theill and Karin, 1993).

Algunos de los factores que estimulan la liberación de la GH son la GnRH, la dopamina (DA) (Wong *et al.*, 1998), la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) (Gahete *et al.*, 2009), el PACAP (Vaudry *et al.*, 2000), la grelina (Unniappan and Peter, 2005), la colecistoquinina (CCK) (Himick *et al.*, 1993), la hormona liberadora de corticotropina (Rousseau *et al.*, 1999), y el neuropéptido Y (Peng *et al.*, 1990).

El principal regulador negativo de GH es la somatostatina 14 (SS14), una hormona peptídica secretada en el hipotálamo (Nelson and Sheridan, 2005); en segundo lugar, encontramos algunos neurotransmisores, como la norepinefrina, la serotonina, el glutamato y el ácido γ -aminobutírico (Peter and Marchant, 1995; Peng and Peter, 1997; Peter and Chang, 1999).

Además de las hormonas y neurotransmisores mencionados, existen otros factores que regulan a la GH, como el ciclo circadiano, la temperatura (Marchant y Peter, 1986), el desarrollo y la disponibilidad de alimento y de pareja (Björnsson *et al.*, 2002; Canosa *et al.*, 2007).

1.3 Distribución de GH en teleósteos

Se ha descrito que esta hormona se distribuye principalmente en la *pars distalis proximalis* (PPD) de la hipófisis de algunas especies como *Odontesthes bonariensis* (Vissio *et al.*, 1996), *Oreochromis niloticus* (Kasper *et al.*, 2006), *Salminus hilarii* (Honji *et al.*, 2013) y *C. humboldtianum* (Juárez-Robles, 2014); en esta última especie es en la que centraremos el presente estudio, de ella sabemos que la GH se encuentra restringida en la PDP de la hipófisis formando un collar alrededor de la neurohipófisis como se observa en la Figura 1, un patrón similar se observa en *Sparus aurata* (Villaplana *et al.*, 2003). Sin embargo, en otras especies como *Seriola dumerii* esta hormona se encuentra en la PDP y la *pars intermedia* (PI) (García-Hernandez *et al.*, 1993).

La expresión de la GH no sólo se restringe a la hipófisis, se han encontrado transcritos de la GH y receptores a ella en el cerebro, en células del sistema inmune, en gónadas, músculo, branquias, riñones, corazón e hipotálamo, lo cual sugiere una acción autocrina/paracrina en dichos sitios (Biga *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Sciara *et al.*, 2006; Canosa *et al.*, 2007).

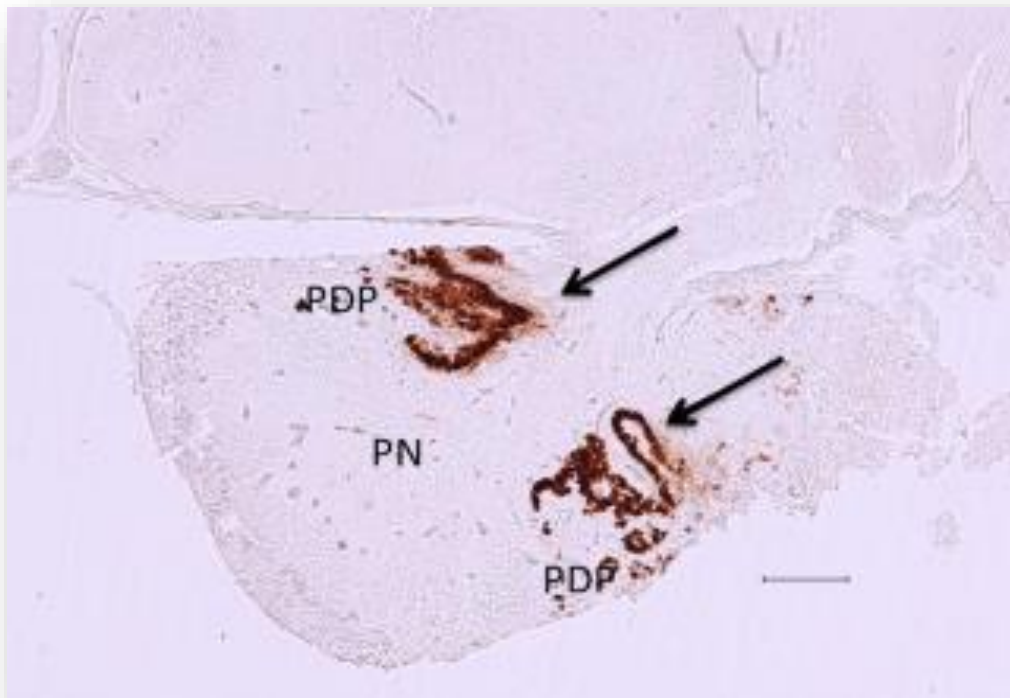


Figura 1.- Distribución de la hormona del crecimiento en hipófisis de *Chirostoma humboldtianum*, *Pars distalis proximalis* (PPD), *Pars nervosa* (PN) las flechas indican la inmunorreactividad de las células somatótropas que rodean la PN a manera de collar como se ha descrito por otros autores, se empleó la técnica inmunohistoquímica de revelado con diaminobenzidina (DAB). Tomado de Juárez-Robles, 2014.

1.4 Estructura del gen de la GH

El gen de GH está formado por 5-6 exones separados por 4-5 intrones dependiendo de la especie; en los mamíferos encontramos en el primer exón, la región 5'-no traducida (5'-UTR). Entre los elementos reguladores de la expresión del gen se encuentran cajas TATA (Aramburo *et al.*, 1997), encontramos también una porción del péptido señal, en el segundo exón se encuentra el péptido señal y el transcrito para la GH, que también está presente en el cuarto y quinto exón donde encontramos la región 3'-UTR; este último exón se divide en el sexto exón para los Acantopterigios como se esquematiza en la Figura 2. El número de bases que forman el gen varía entre 1.6-4 Kb (Almuly *et al.*, 2000); en él están presentes al menos un elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE), un elemento de respuesta al ácido retinoico (RARE) (Farchi-Pisanty *et al.*, 1997; Sternberg y Moav, 1999), un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) (Bernardini *et al.*, 1999) y también un elemento de respuesta al cAMP (CRE) (Argenton *et al.*, 1996). El factor de transcripción más conocido para la expresión del gen de la GH es el factor de transcripción de la hipófisis anterior (PIT-1) (Argenton *et al.*, 1993,1996, 2002; Farchi- Pisanty *et al.*, 1997; Bernardini *et al.*, 1999).

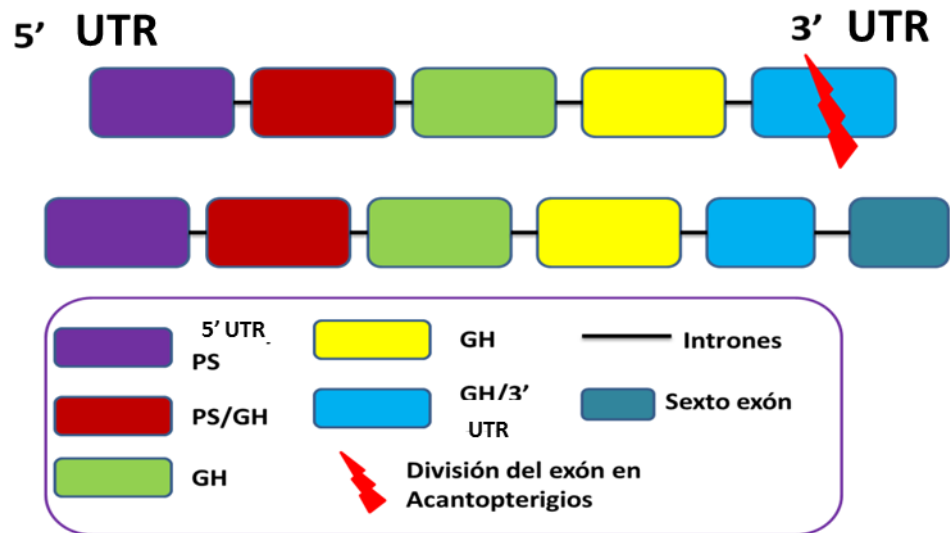


Figura 2.- Estructura del gen de GH, en la parte superior de la imagen se observa un esquema del gen de 5 exones presente en Ostariophysics que por división del exón 5 origina el gen de 6 exones en acantopterigios que se observa en la parte intermedia de la imagen (Tomado de Cárdenas Reygadas, 2012).

1.5 Receptor para la GH

El receptor para la GH (GHR) es una molécula transmembranal perteneciente a la familia de receptores a citocinas; se incluye en los receptores tipo 1 que utilizan la vía de señalización JAK/STAT y cuya característica conservada es la de presentar residuos de cisteína en la región N-terminal de su dominio extracelular (Cosman, 1993). Existe más de una vía que puede ser activada por la unión de la GH a su receptor, entre ellas la vía de la fosfolipasa C (PLC), las cinasas de proteínas activadas por mitógenos MAPK y los sustratos receptores de insulina (IRS) I y II (Ridderstrale, 1994; VanderKuur, 1997). El GHR posee un dominio amino terminal extracelular en donde se une la hormona; el dominio extracelular del receptor consta de dos dominios de fibronectinas tipo III β conectadas por una unión delgada y flexible, estos dos dominios están conectados a un dominio rígido helicoidal; el GRH presenta un solo dominio transmembranal y otra parte intracelular en el carboxilo terminal, el dominio intracelular es el que participa en la transducción de señales y presenta dos dominios o cajas BOX1 a las que se une la cinasa de tirosinas JAK2, que parece ser importante para la internalización del receptor, y BOX2. Los dominios BOX1 poseen TYR que son los sustratos para la fosforilación por JAK2 y por lo tanto son esenciales para la activación de las vías intracelulares. Cabe señalar que estos receptores requieren la dimerización para su activación (Brooks *et al.*, 2008; Herrington and Carter-Su, 2001).

El GHR tiene una vida media de 1 h y es constantemente degradado en ausencia de la GH. Se conocen dos mecanismos para desensibilizar este receptor; el primero es mediante la unión a su ligando, de esta forma se induce su endocitosis lo cual requiere la unión de la ubiquitina ligasa (van Kerkhof, Putters, y Strous, 2007); la segunda forma es mediante el efecto de la metaloproteasa, enzima convertidora de TNF α , que actúa sobre el dominio extracelular del GHR cortándolo y resultando en la proteína de unión a la hormona del crecimiento (GHBP) (Cowan *et al.*, 2005).

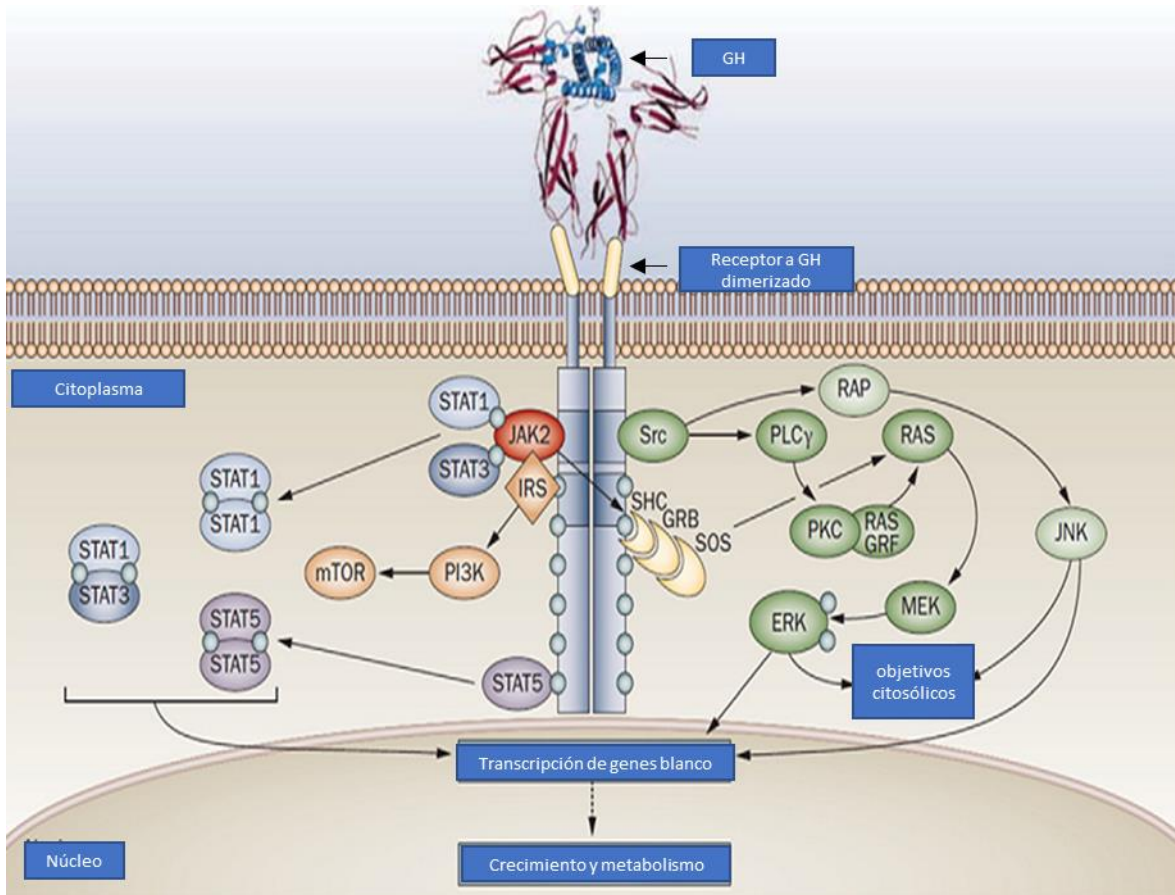


Figura 3.-Esquema de un receptor para la GH dimerizado por la unión con su ligando (GH), podemos observar los eventos que ocurren cascada abajo de la vía de señalización hasta llegar al núcleo celular donde activa la transcripción de genes relacionados con el crecimiento y las actividades metabólicas. (P, fósforo; JAK2, Janus Cinasa 2; GH, Hormona del Crecimiento; GHR, Receptor para la Hormona del Crecimiento; STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription). Tomado de Brooks and Waters, 2010.

1.6 Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa (PACAP)

1.7 Aspectos generales

El polipéptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) es un neuropéptido que se aisló por primera vez de extractos crudos de hipotálamo de oveja en 1989 por el grupo de Miyata; este péptido de 38 residuos de aminoácidos tiene la capacidad de incrementar los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) y causa la liberación de algunas hormonas hipofisarias, tal es el caso de la prolactina, la hormona del crecimiento, la hormona adrenocorticotrófica y la hormona luteinizante (Mucio-Ramírez *et al.*, 2004). Además participa activamente en procesos tales como la proliferación y la diferenciación celular, neuroprotección, muerte celular y actúa como neurotransmisor (Harmar *et al.*, 2012).

El PACAP es miembro de la superfamilia Glucagón-Secretina, de ellos es precisamente PACAP el que se encuentra más conservado evolutivamente a través de los vertebrados e incluso en invertebrados (Reglodi *et al.*, 2000). Existen dos formas biológicamente activas del PACAP, una de 38 y otra de 27 residuos de aminoácidos (Sherwood *et al.*, 2000); el PACAP 38 es un péptido de 38 aminoácidos de los cuales comparte 28 aminoácidos de la región N-terminal con el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) mientras que PACAP 27 es una forma truncada de PACAP 38 que contiene solo los primeros 27 aminoácidos; ambas formas del PACAP derivan del mismo precursor de PACAP a través de proteólisis postraducciona (Rawlings, 1994).

En cuanto a su estructura molecular en los teleósteos, se sabe que el PACAP de salmón (Parker *et al.*, 1993) y de pez gato (McRory *et al.*, 1995) es altamente homólogo al PACAP de mamíferos y que difiere solo en tres o cuatro sustituciones en el extremo C-terminal.

La estructura tridimensional del PACAP presenta dos α -hélices separadas por una región no helicoidal. La alta conservación en la secuencia de aminoácidos del PACAP en los diferentes animales de la escala filogenética muestra la importancia biológica de este neuropéptido (Hyde *et al.*, 1988; Vaudry *et al.*, 2000).

1.8 Distribución

La distribución de este neuropéptido es amplia, se encuentra en el sistema nervioso central (SNC), en algunas glándulas y órganos, en la corteza cerebelar, hipocampo, septum, tálamo, hipotálamo, eminencia media, tallo cerebral y médula espinal, así como en algunas glándulas y órganos extrahipofisarios como ojo, tracto gastrointestinal, ovario y testículo (Arimura *et al.*, 1991; Basille *et al.*, 1993; Beaudet *et al.*, 1998; Legradi *et al.*, 1994; Moller *et al.*, 1999; Fradinger y Sherwood, 2000). Existe una alta concentración de PACAP en los núcleos hipotalámicos supraóptico (SON) y paraventricular (PVN), en el núcleo habenular, en el tallo cerebral, especialmente en el núcleo pontino, en el parabraquial lateral y en el complejo vagal, así como en los núcleos olfatorios, en células de Purkinje del cerebelo, en los cuerpos celulares de las neuronas columnares intermediolaterales de la médula espinal, en los núcleos vestibular y coclear, en el complejo amigdaloides, el núcleo talámico paraventricular, en el pretectum, en el núcleo parabraquial, en el núcleo trigeminal sensorial y en el núcleo del tracto solitario (Vaudry *et al.*, 2000).

En *C. humboldtianum* se ha estudiado la distribución de este péptido por inmunohistoquímica (Chávez-Maldonado y Cárdenas-Reygadas, 2011), y la del transcrito mediante hibridación *in situ* (Loredo-Ranjel, 2012). Estos estudios muestran que el péptido se localiza en el encéfalo y en la hipófisis, en el núcleo preoptico periventricular (NPP), en las neuronas multipolares del área preóptica que extienden sus proyecciones hacia las regiones anteriores o posteriores del cerebro, e incluso algunas de estas proyecciones llegan hasta la adenohipófisis, en cerebro medio y posterior, en el núcleo medial longitudinal facial, en los núcleos motores de los nervios trigémino y facial, telencéfalo, quiasma óptico, tectum y en cerebelo (células de Purkinje).

1.9 Receptor para PACAP

El receptor a PACAP es un receptor de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR`s). Las proteínas G son GTPasas heterodiméricas que ayudan a regular la síntesis de segundos mensajeros intracelulares como la adenosina monofosfato cíclica (cAMP). Los GPCR`s presentan siete dominios transmembranales, tres asas extracelulares y tres intracelulares, un dominio amino extracelular y un dominio carboxilo terminal intracelular (Lefkowitz, 2004); esta superfamilia está dividida en siete clases, el receptor para PACAP pertenece a la clase II.

Los receptores de la clase II tienen un residuo N-terminal extracelular de 120-140 aminoácidos con el que puede interactuar con hormonas glicoproteicas y al parecer es su principal zona de interacción receptor-ligando (Martin *et al.*, 2005); presentan seis o siete residuos de Cys conectados por tres enlaces disulfuro lo que forma un dominio globular que al parecer está conservado en la clase II (Grauschopf *et al.*, 2000). Dentro de esta clase se propone que el receptor para PACAP está dentro de la subclase B1, cuyos ligandos son hormonas polipeptídicas de 27-141 residuos de aminoácidos (Harmar 2001); todos los miembros de este grupo son capaces de regular las concentraciones intracelulares de cAMP por el acoplamiento de adenilato ciclasa con la subunidad $G\alpha_s$ (Martin *et al.*, 2005).

Los receptores que pueden interactuar con el PACAP son VPAC1 y VPAC2, aunque estos dos no son específicos para PACAP ya que pueden reaccionar al estímulo del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), mientras que el receptor PAC1 es específico para el PACAP.

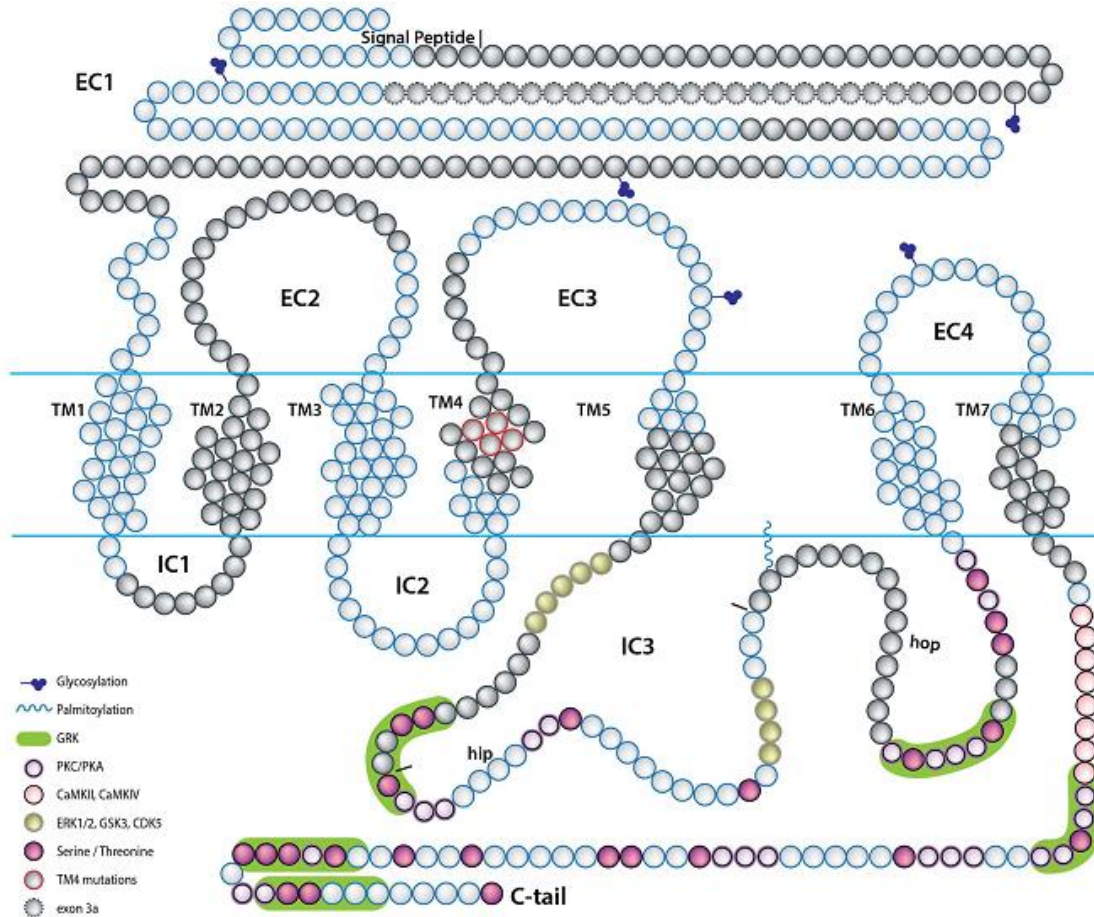


Figura 4 . Estructura del receptor PAC1. En este esquema podemos observar las siete regiones transmembranales (TM) del receptor PAC1 y los 4 dominios extracelulares (EC) que participan en diferentes procesos de reconocimiento de ligando; se observan 3 dominios intracelulares (IC) así como el dominio carboxilo terminal (C-tail) responsable de la transmisión de la señal extracelular al interior de la célula (Tomado de Blechman and Gil Levkowitz, 2013).

2. Antecedentes

2.1 Relación entre el PACAP y la GH

Existe una estrecha relación entre las neurohormonas y los neurotransmisores en general, esto se debe a las acciones coordinadas que realizan, y es bien sabido que el PACAP y la GH presentan una interacción dosis dependiente (Wong *et al.*, 1998; Martínez-Fuentes *et al.*, 1998; Sze *et al.*, 2007).

Wong y colaboradores, mostraron que existen fibras inmunorreactivas a PACAP en proximidad a células productoras de la GH en hipófisis de pez dorado *Carassius auratus*; mediante inmunohistoquímica localizaron el péptido en la periferia de la PRP, así como en la PDP sugiriendo que el PACAP podría tener influencia en la liberación de la GH en esta especie de teleosteo (Wong *et al.*, 1998).

En el mismo año se demostró en cultivos de células somatotropas de porcino que tanto PACAP 27 como PACAP 38 estimulan la liberación de la GH y la acumulación del mRNA de la GH siendo el PACAP 27 el que presentó un incremento más rápido en el mensajero (Martínez Fuentes y col., 1998).

Posteriormente y siguiendo su línea de trabajo, Wong y col., en 2005, localizaron fibras nerviosas del PACAP sobrelapadas con la distribución de las células somatotropas en la PDP de *Ctenopharyngodon idellus*.

Chavez-Maldonado y Cárdenas-Reygadas (2011) describieron la distribución del PACAP en el cerebro de *C. humboldtianum* y además lo encontraron en la *pars nervosa* de la hipófisis.

Loredo-Ranjel describió mediante hibridación *in situ* la distribución del transcrito de PACAP en cerebro anterior de *C. humboldtianum*; el transcrito fue localizado tanto en el área dorsal como ventral del telencéfalo, diencéfalo e hipófisis (Loredo-Ranjel, 2012). En el caso de la distribución de GH en la Hipófisis de *C. humboldtianum* se describió como un collar que rodea la neurohipófisis y que se limita a la PDP (Juárez-Robles, 2014).

3. Modelo de estudio

El género *Chirostoma* pertenece a la familia de los atherinópsidos, la distribución natural del género abarca los estados de Michoacán, Jalisco, Nayarit, Aguascalientes, Estado de México y Guanajuato. *Chirostoma humboldtianum* es una de las especies más importante dentro del grupo de los charales ya que es nativo de México. Los charales gozan de gran aceptación en la dieta del pueblo mexicano, debido a su carne blanca y suave con pocas espinas y a su exquisito sabor (Barbour, 1973; Rojas, 2005; Ezcurra, 1998; Rosas, 1976).

El periodo reproductivo de las poblaciones silvestres es de cuatro o cinco meses, con algunos meses de intensa actividad que corresponde a los meses de marzo-junio (Blancas *et al.*, 2008). Tienen un crecimiento relativamente lento, alcanzando la madurez sexual al año de vida, con una talla de alrededor de los 13 cm. No presentan dimorfismo sexual, la proporción sexual para la reproducción es de tres a cuatro machos por cada hembra (Rojas, 2006).

A pesar del interés en el cultivo de *Chirostoma*, poco se ha avanzado en el conocimiento de su reproducción y aún se tienen problemas con su baja tasa de crecimiento, la talla comercial y la alta tasa de mortalidad en la etapa larval. Hace falta investigación con ensayos piloto sobre la rentabilidad del cultivo (Rojas, 2013).

4.-Justificación

Dado que, a la fecha, no se cuenta con una correlación directa entre el PACAP y la hormona de crecimiento para ningún representante del grupo de los Atherinópsidae, y en particular, para ninguna especie endémica mexicana, el conocimiento de la regulación endócrina del crecimiento y reproducción de esta especie es importante para implementar en el futuro su cultivo debido a que, actualmente, el hábitat de este pez está siendo alterado por desforestación, sobreexplotación de mantos acuíferos para drenes agropecuarios y una alta densidad poblacional humana circundante (CONABIO, 2012). Para ello, se considera importante el conocimiento de los ciclos hormonales que están relacionados con el crecimiento y la reproducción de esta especie.

5.- Objetivo general

Determinar si en el pez *C. humboldtianum*, el PACAP y la GH se encuentran colocalizado en las proximidades de las células somatotropas en la hipófisis de esta especie durante las diferentes etapas del ciclo sexual.

Objetivos particulares

Colocalizar a PACAP y a la GH en la hipófisis de macho y hembras de *C. humboldtianum* en la etapa de recrudescencia.

Colocalizar a PACAP y a la GH en la hipófisis de machos y hembras de *C. humboldtianum* en la etapa de madurez.

Colocalizar a PACAP y a la GH en la hipófisis de machos y hembras de *C. humboldtianum* en etapa postovulatoria.

6. Materiales y métodos

6.1 Trabajo de campo

Los ejemplares de *C. humboldtianum*, fueron colectados en la laguna de Zacapu, Michoacán, México, localizada entre los 19°40'40" y 19°49'26" latitud Norte, 101° 46' 25" y 101° 47' 25" longitud Oeste, para obtener muestras en las etapas de recrudescencia sexual, madurez sexual y postovulatoria y/o regresión basados en el aspecto histológico de la gónada. Previamente a la toma de muestras, los peces fueron anestesiados con triclaínmetanosulfonato (MS 222) a una concentración de 0.05% (Sigma-Aldrich)

Una vez anestesiados, los peces fueron sacrificados por decapitación. Los organismos fueron sexados con base en las características externas de las gónadas. La hipófisis y las gónadas fueron removidas y fijadas en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y paraformaldehído al 2% y ácido pícrico, a pH de 7.2 (Stefanini *et al.*, 1990). La hipófisis y gónada de un mismo organismo fueron colocadas en un frasco por separado.

Todas las muestras colectadas fueron trasladadas al laboratorio de endocrinología de peces de la FES-Iztacala, donde posteriormente fueron procesadas y analizadas.

6.2 Trabajo de laboratorio

Las muestras fueron procesadas de acuerdo con la técnica de Martoja (1970) de la siguiente manera:

Los tejidos fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol (70%, 80%, 90%, 96% y 100%), dejando las muestras 30 min en cada concentración, excepto en la última, en la cual se dejaron por 45 min. Una vez deshidratados los tejidos, se colocaron en alcohol amílico durante 24 h. Posteriormente, se aplicaron 2 cambios de parafina durante 2 h cada una. Finalmente, se incluyeron en Paraplast y se realizaron cortes sagitales en serie, con un grosor de entre 5-7 μm para las hipófisis y de 3-5 μm para las gónadas, en un micrótopo de rotación LEICA RM 2125.

6.3 Revisión del estado gonádico.

Los cortes se desparafinaron durante 30 min, para posteriormente ser colocados en xilol I y II por 5 min en cada uno. Los tejidos fueron rehidratados pasándolos por alcoholes de concentraciones descendientes (100%, 96%, 90%, 80% y 70%), después se hidrataron con agua. Se procedió a la tinción con hematoxilina de Harris, sumergiendo las muestras en este colorante por 5 min y en seguida lavados con agua. Por último, se colocaron en eosina unos segundos para contrastar los núcleos. Nuevamente, los cortes fueron deshidratados y se montaron con Entellan. Los cortes fueron observados en un microscopio Nikon ® Eclipse 400 y las imágenes obtenidas utilizando el programa NIS Elements de Nikon ®.

6.4 Inmunohistoquímica

Los cortes fueron montados en portaobjetos tratados con 3-aminopropil trietoxisilano (TESPA) para la realización de la técnica inmunohistoquímica (Elson *et al.* 1995, Taylor and Burns, 1974). Antes de realizar la técnica inmunohistoquímica los cortes se desparafinaron durante 30 min 60° C; posteriormente fueron colocados en xilol e hidratado el tejido mediante concentraciones descendientes de alcohol (100%, 96%, 90%, 80% y 70%); al concluir la hidratación fueron inmersos en una solución de 5% H₂O₂ - 100 volúmenes de PBS 1x durante 30 min para desactivar la peroxidasa endógena. Para eliminar la unión inespecífica se utilizó una solución de 5 ml de leche descremada con 300 µl de Triton a temperatura ambiente (23°C) durante 30 min.

Para la colocalización del PACAP y la GH se utilizaron tres variantes al momento del revelado: una con el Kit TMB blue de ®Vector laboratories, una con DAB y una con DAB-Níquel, (Hancock, 1984) esta última solo se utilizó en la doble inmunohistoquímica que presenta la localización de ambos anticuerpos sobre el mismo corte, en cuanto a la primera y segunda variantes se utilizaron cuando la localización se realizó en cortes seriados.

En el caso de la co-localización en cortes seriados el procedimiento fue de la siguiente manera: los cortes de la primera serie fueron incubados con el anticuerpo anti-KcGH hecho en conejo (en dilución 1:2500 en PBS) durante toda la noche a 4°C. Los cortes de la segunda serie fueron incubados con el anticuerpo anti-PACAP-27 hecho en conejo (Cat H-052-02, Phoenix Pharmaceutical) (dilución 1:200 en PBS) y se dejaron incubando toda la noche. La dilución óptima de dichos anticuerpos fue estandarizada utilizando una serie de diluciones. Los cortes de la serie 3 fueron utilizados como control. Subsecuentemente, los cortes fueron lavados con PBS 1x e incubados a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:250 en PBS) (CAT 31466) de Invitrogen durante dos horas y lavados nuevamente con PBS 1x.

Durante el revelado los cortes fueron sometidos al azar al revelado con diaminobencidina o con el Kit TMB blue; en el primer caso se procedió de la siguiente manera:

a) Los cortes fueron tratados con una solución de 3,3-diaminobenzidina con 0.3% de peróxido de hidrógeno por 15 min, los cortes fueron deshidratados, aclarados en xilol y montados con Entellan.

b) El kit TMB blue se preparó al momento de acuerdo a las indicaciones del fabricante, solo se dieron dos lavados de 2 min al finalizar el revelado de 15 min y se procedió a la deshidratación y el montado con Entellan.

La doble inmunohistoquímica se realizó sobre la misma serie del tejido, después de la rehidratación y los respectivos bloqueos los cortes se dejaron incubando toda la noche con el anticuerpo anti-Kc GH, al día siguiente se realizaron tres lavados de 5 min con PBS 1x, realizado esto se dejó incubando 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa, se realizaron tres lavados nuevamente con PBS 1x de 5 min cada uno, se reveló la reacción con DAB por 30 min y se continuó con los lavados de 5 min con PBS, se realizó un nuevo bloqueo con Blotto y se dejó incubando toda la noche con anti- PACAP-27 en una dilución 1:200, al día siguiente se realizaron tres lavados con PBS, se incubó con el anticuerpo secundario por 2 h a temperatura ambiente y se reveló la reacción con DAB diluido en una solución de níquel (125µl de níquel en 12.5 ml de PBS) por 15 min, la solución de níquel sustituye al PBS solo y brinda una tinción negra a la reacción. Se realizaron tres lavados con PBS, se deshidrato, se aclaró con Entellan y se montó con Entellan.

Los resultados fueron analizados con un microscopio Nikon eclipse E400 y el programa NIS-Elements de NiKon.

6.5 Determinación del número de fibras PACAP positivas que rodean a las células somatotropas.

Se llevó a cabo un un conteo del número de fibras en las proximidades de 20 células somatotropas en cada una de las etapas del ciclo sexual incluyendo organismos inmaduros, se verificó la normalidad de los datos, para ello se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba estadística de Kruskal wallis fue efectuada para determinar si existen varaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

7. Resultados

Se observó presencia de células somatotropas en la adenohipófisis y de fibras inmunorreactivas a el PACAP en la neurohipófisis y muy próximas a las células somatotropas de la hipófisis, la relación aproximada fue de 4 a 7 fibras inmunorreactivas al PACAP por cada célula somatotropa. Esta relación varió ligeramente dependiendo de la etapa del periodo reproductivo, si bien, no se encontró una diferencia significativa, sí se detectó una tendencia a una mayor presencia de axones alrededor de las células somatotropas durante la fase de madurez, seguidas en orden decreciente de las etapas postreproductiva, inmadurez y de recrudescencia (Tabla 1).

<i>Etapa sexual</i>	<i>Media de Fibras inmunorreactivas a PACAP/ célula somatotropa</i>	<i>Desviación estándar</i>
<i>Inmadura</i>	5.35	1.09
<i>Recrudesciente (vitelogénesis)</i>	5.25	0.96
<i>Madura</i>	6.55	0.68
<i>Regresión o postreproductiva</i>	5.9	1.16

Tabla 1. Comparación entre el número de fibras nerviosas reactivas a PACAP por cada célula reactiva a GH en las diferentes etapas reproductivas de *C. humboldtianum*.

En la figura 5 pueden observarse las imágenes de la reacción en la hipófisis de una hembra del mes de septiembre que de acuerdo con el corte de la gónada se encuentra en previtelogénesis correspondiente a la etapa de inmadurez, se encontraron pocas fibras inmunorreactivas en las proximidades de las somatotropas, la reacción a GH adquirió el arreglo en forma de collar alrededor de la neurohipófisis. Las fibras con PACAP pueden observarse en un tono casi negro gracias a la reacción DAB-Níquel.

Las hembras con folículos vitelogénicos se encuentran la etapa de recrudescencia, y en las colectas estaban presentes en el mes de mayo principalmente (figura 6), aunque no de manera exclusiva, pues también las encontramos en el mes de junio (figura 7). Durante este periodo pudieron observarse 5 a 6 fibras inmunorreactivas a PACAP por cada célula somatotropa, también se localizaron zonas del cerebro con reacción a GH, como el núcleo preóptico paraventricular (NPPv) y el tectum óptico OT, en las que en varias ocasiones se observó reacción a la GH. Durante el mes de septiembre se encontraron organismos en vitelogénesis y regresión como lo muestra la figura 8, donde puede apreciarse el corte de hipófisis de una hembra madura y un macho en regresión, este último presentó una media de 5.2 fibras nerviosas por cada somatotropa mientras que en la hembra se encontraron en promedio 7 fibras por cada célula, siendo constante con otra hembra madura que se aprecia en la figura 9.

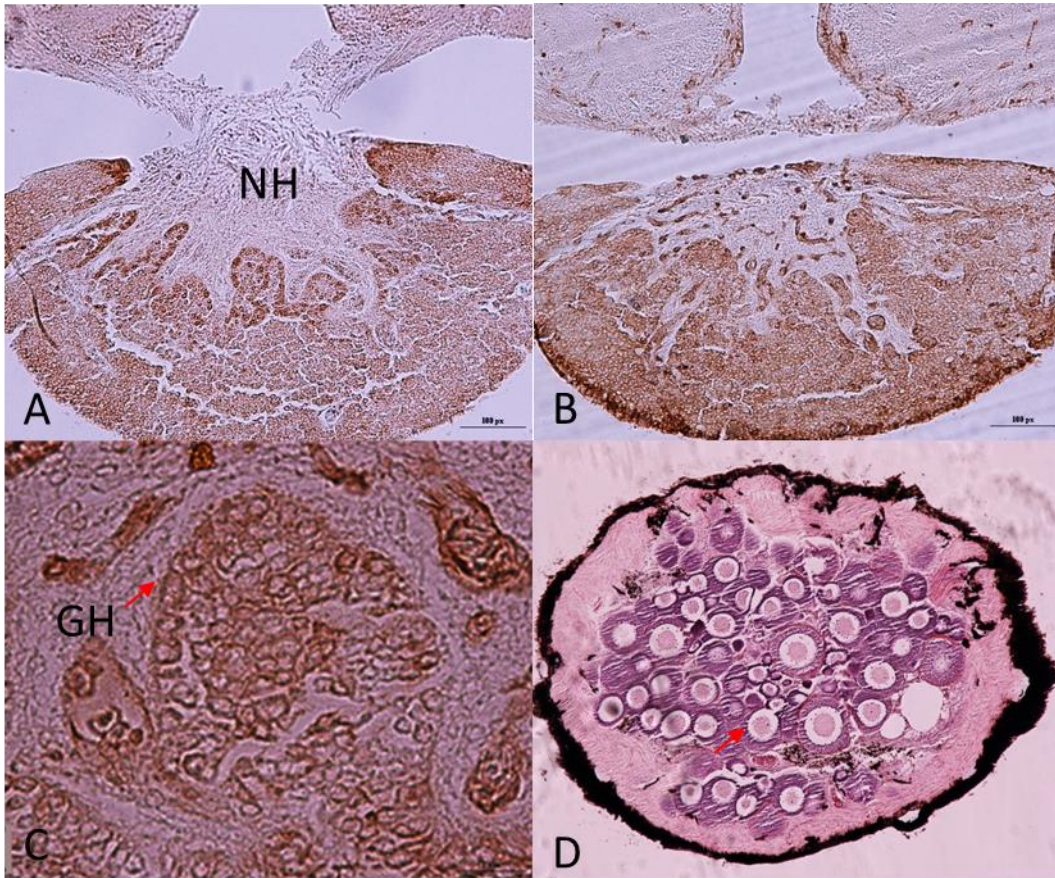


Figura 5. A-C) Hipófisis de una hembra del pez *Chirostoma humboldtianum* colectada en septiembre en la que se puede observar la colocación de PACAP en la neurohipófisis y de GH en la adenohipófisis que se distribuye a manera de collar rodeando la neurohipófisis 20 x B) Corte sagital donde puede observarse la reacción a PACAP en la neurohipófisis, además pueden observarse en la misma zona vasos sanguíneos con células inmunorreactivas a PACAP 20 x C) Acercamiento a la reacción de PACAP en las células somatótropas 100x. La flecha señala una célula somatótropa con fibras nerviosas reactivas a PACAP teñidas de negro pues fue revelada la reacción con un complejo DAB-níquel D) Ovario de una hembra inmadura.

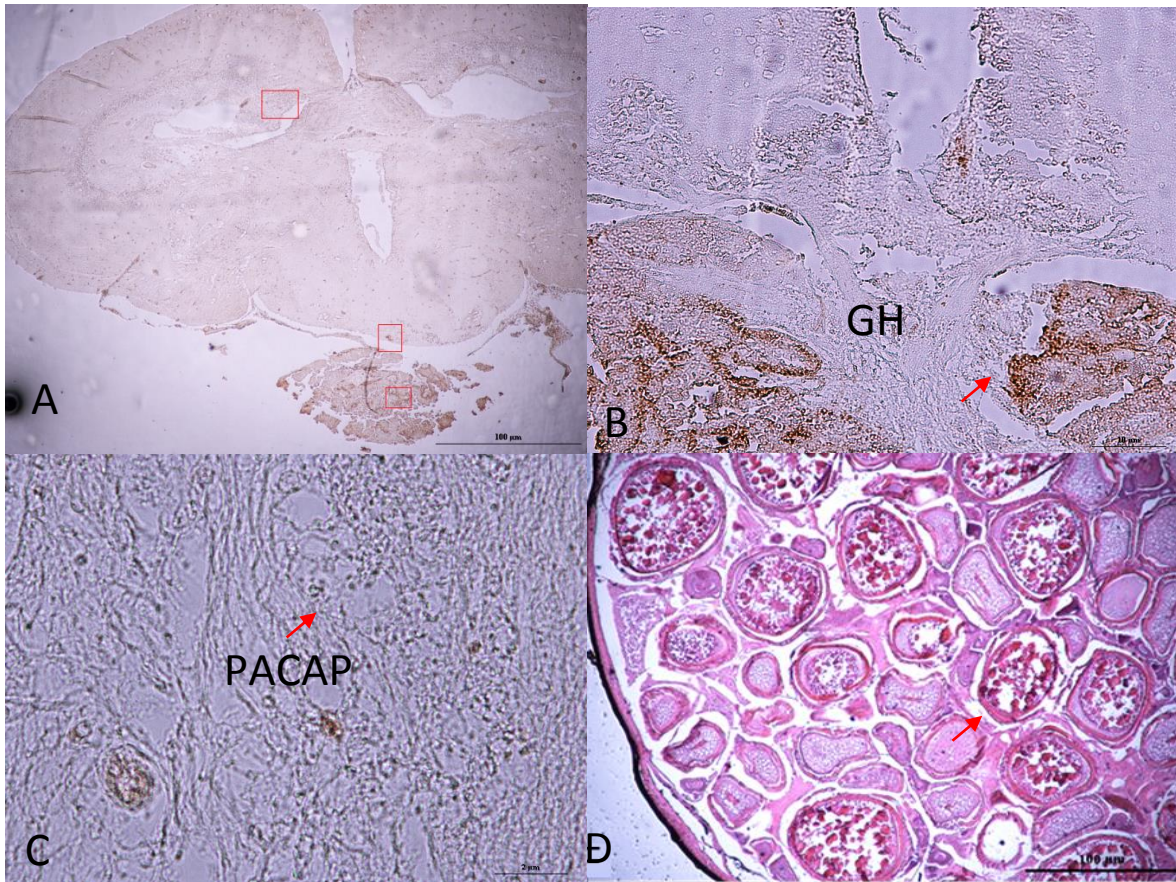


Figura 6.- A) Encéfalo con hipófisis de una hembra colectada en Mayo, con una tinción PACAP-GH, en el recuadro en rojo se observa la inmunorreacción a PACAP en neurohipófisis y en cerebro B) Hipófisis con el típico arreglo que presenta la inmunorreacción a Gh en forma de collar rodeando la NH, la flecha señala la reacción específica a GH en la zona de interacción con PACAP C) Acercamiento de las células somatótropas teñidas en café junto a pocas fibras PACAP teñidas de negro. D) Gónada con folículos vitelogénicos.

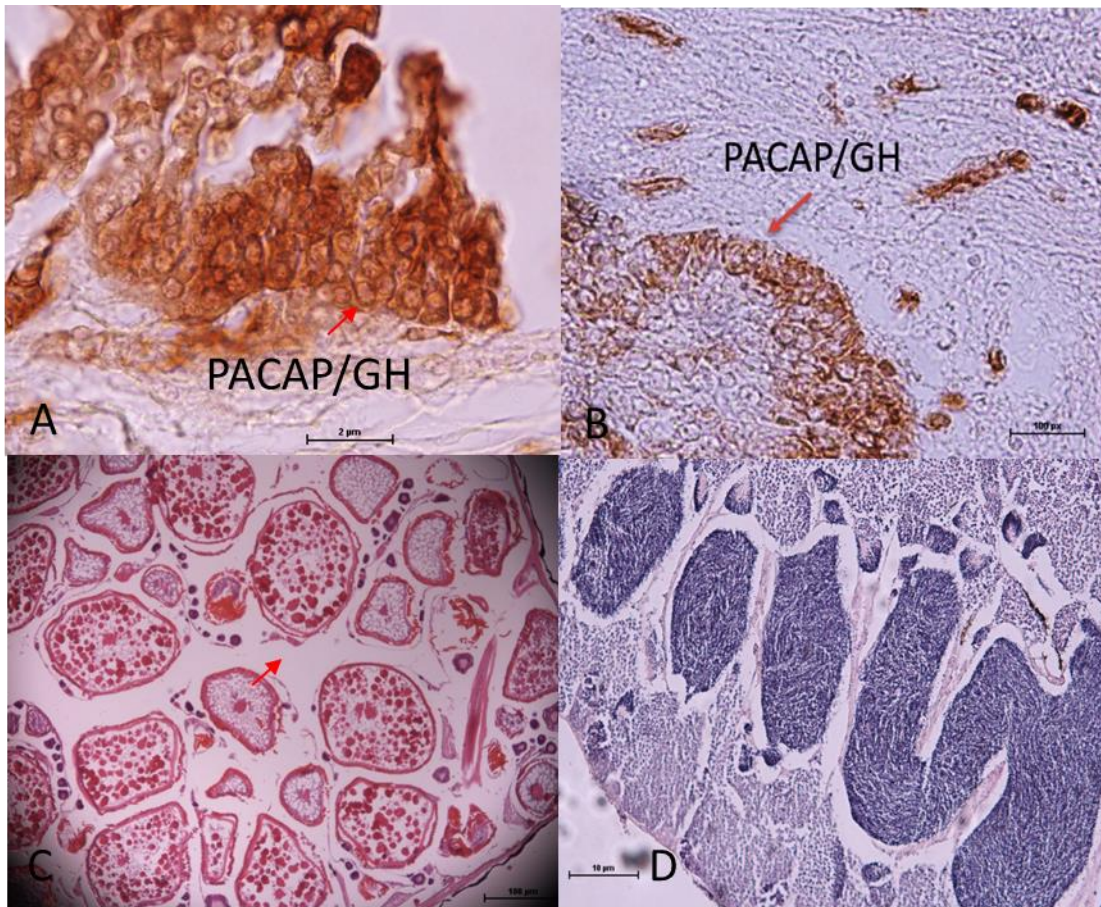


Figura 7.- A) Hipófisis de una hembra de junio 100X. mostrando una doble reacción PACAP-GH B) Hipófisis de macho maduro de junio 100X mostrando una reacción a PACAP-GH C) Ovario en vitelogénesis temprana. D) Testículo con presencia de espermatozoides.

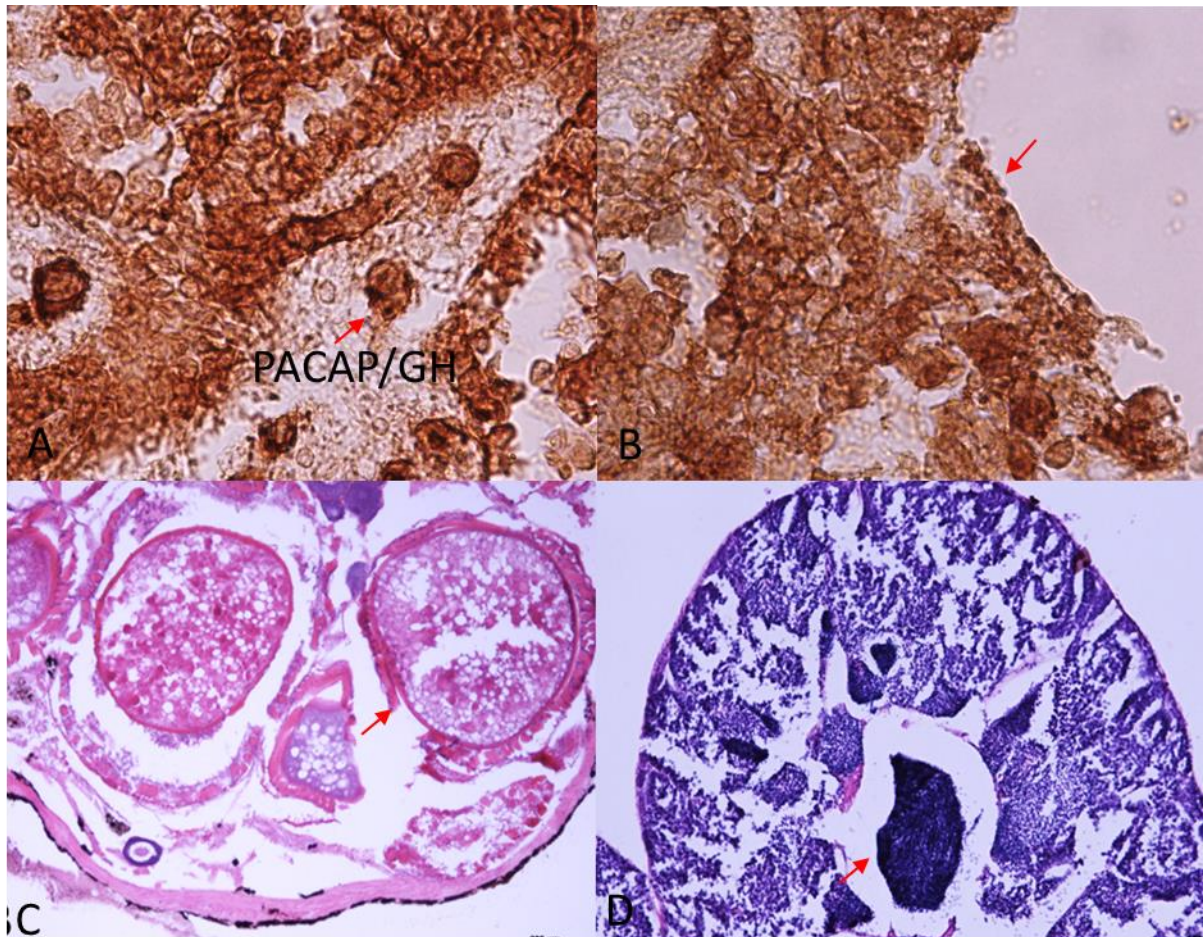


Figura 8.- A) Hipófisis de una hembra madura de septiembre (100X). B) Hipófisis macho septiembre visto a 100X. C) Ovario en vitelogénesis tardía. D) Testículo en regresión.

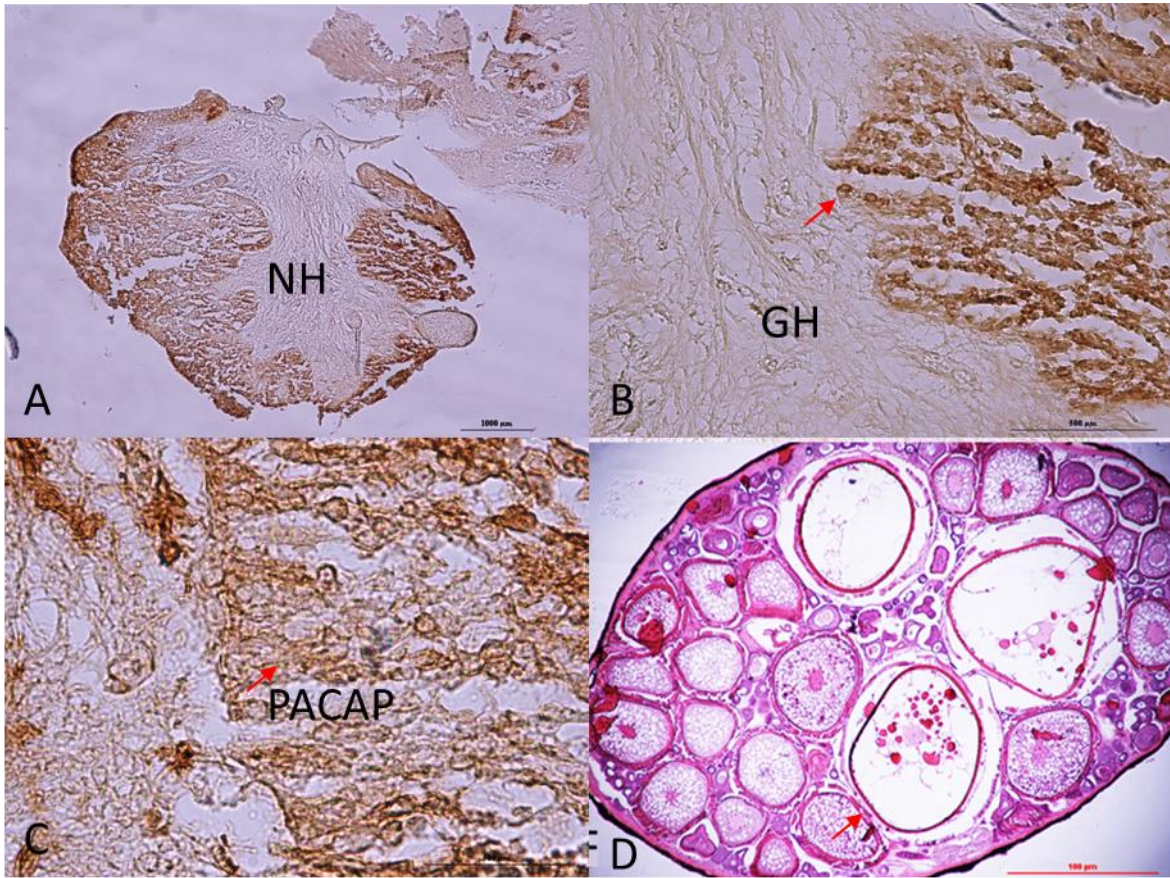


Figura 9.-A) Corte sagital de una hipófisis de hembra en Madura con reacción a PACAP en la neurohipófisis. B) Corte sagital de hipófisis de una hembra con reacción a GH en la adenohipófisis y presencia de fibras reactivas a PACAP. C) Acercamiento a la NH y adenohipófisis. Obsérvense fibras inmunorreactivas. D) Gónada en estado de madurez.

Al final del ciclo sexual se encuentra la etapa de regresión representada por dos hembras de mayo (figura 10 y 11) en las cuales se observaron folículos atrésicos sin vitelo, en esta etapa se encontraron por cada somatótropas 6 fibras inmunorreactivas a PACAP. En la figura 11 observamos algunas fibras PACAP que se acercan a la adenohipófisis. El macho del mes de mayo (figura 10) se encontraba en etapa de madurez mientras que el segundo macho del mismo mes (figura 11) se encontraba en recrudescencia.

Por último, se pueden observar diferentes imágenes de la hipófisis de una hembra de junio (figura 12) en las imágenes A y B se observa una tinción con el kit TM blue en las que se aprecian las fibras de PACAP teñidas de azul oscuro mientras que las somatótropas se tiñeron de un azul claro rodeando la neurohipófisis, en las figuras C y D encontramos células somatótropas escasas rodeando la neurohipófisis en una reacción DAB-Níquel.

También pudieron observarse algunas fibras inmunorreactivas a PACAP en las proximidades de células que no son somatótropas.

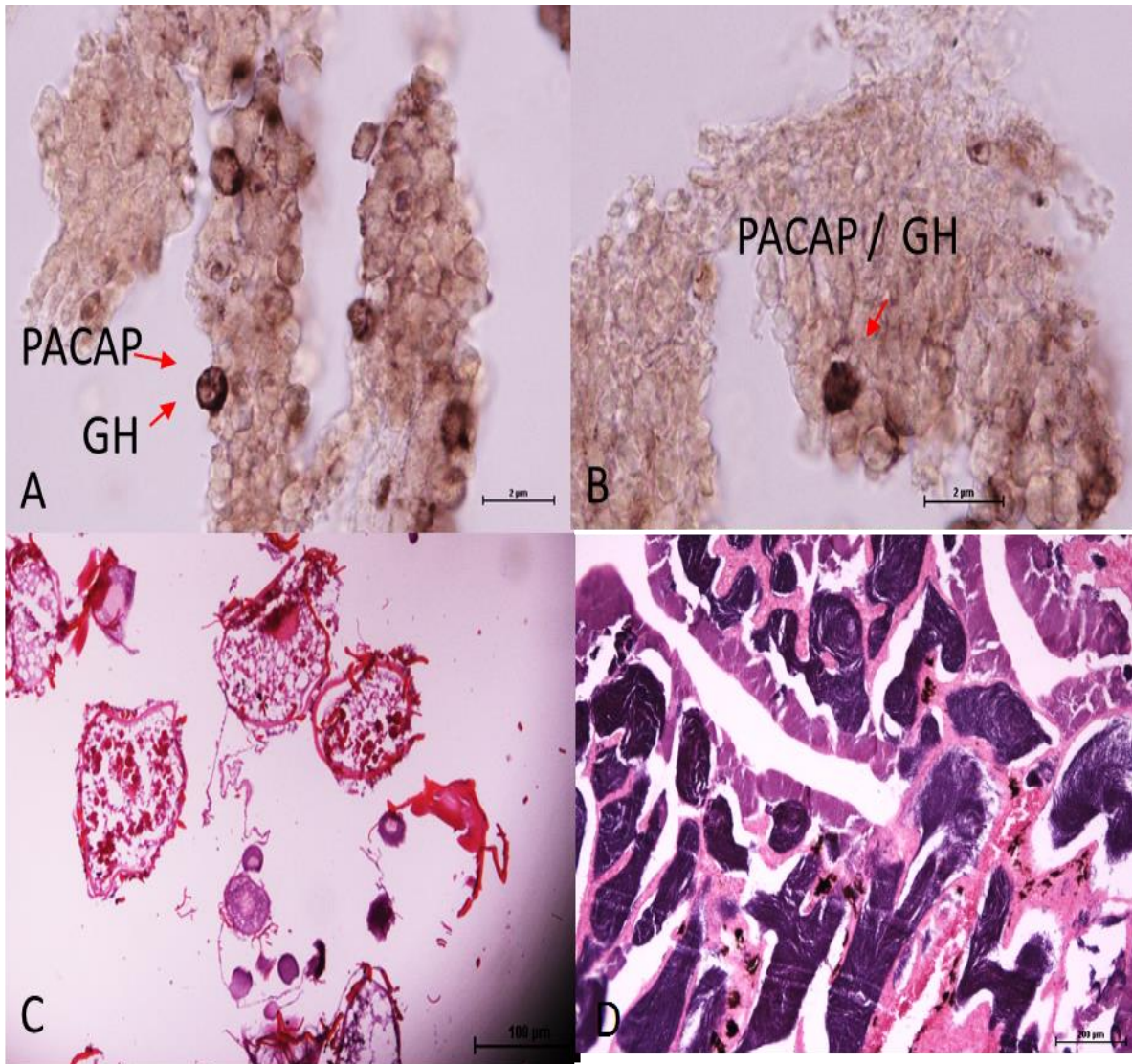


Figura. 10.- A) Células somatotropas de la hipófisis de una hembra de marzo en el periodo de regresión. Vista a 100X. B) Hipófisis de un macho adulto visto a 100X, aquí se muestra la reacción en una célula somatotropa. C) Ovario correspondiente a la hembra de la Figura A, en la que se observan folículos con vitelo y algunos folículos atrésicos. D) sección de un testículo en estado de madurez, los espermatozoides presentes tienen una tinción morada correspondiente al desarrollo de éstos.

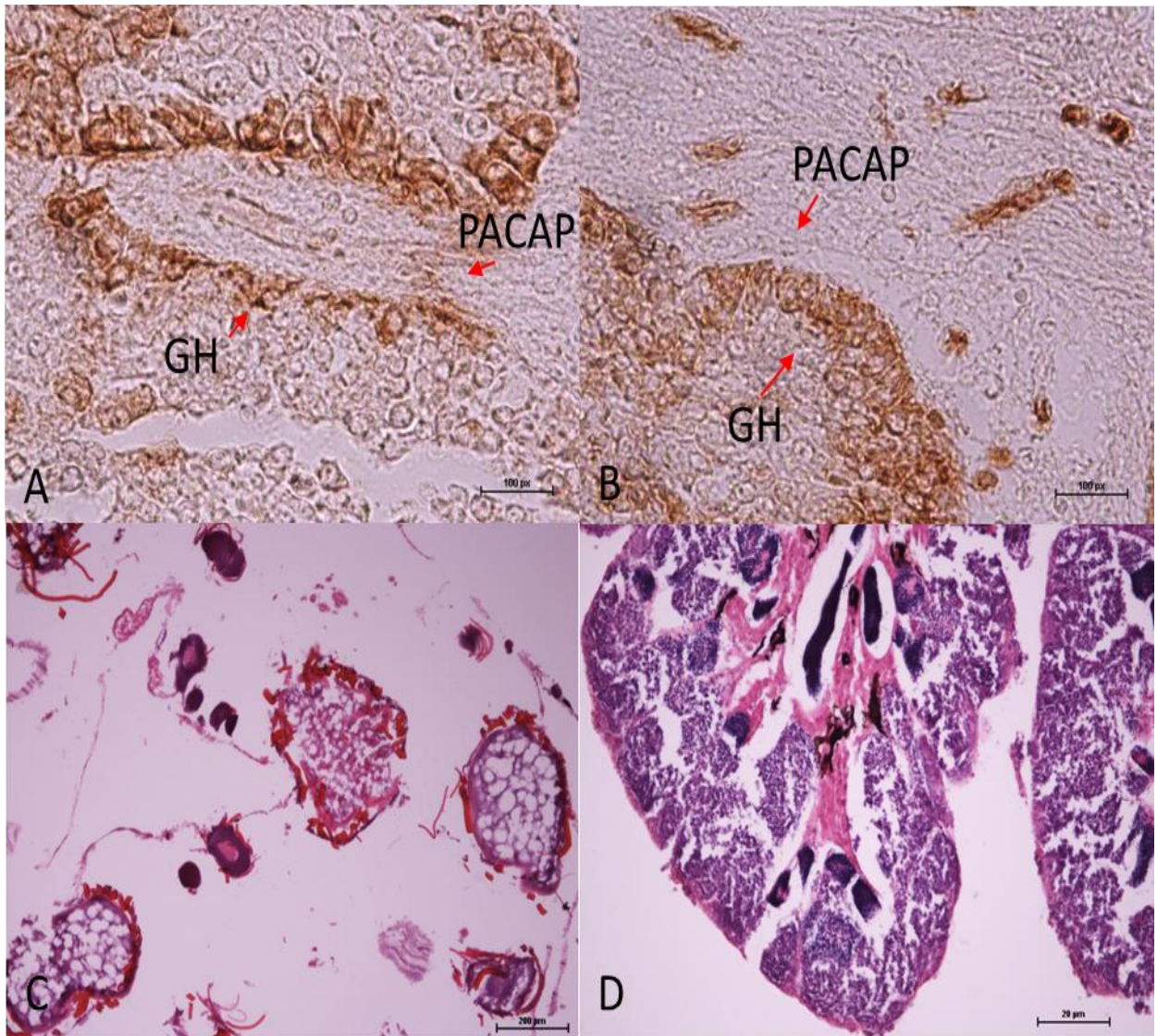


Figura. 11.- A) Hipófisis de una hembra postovulatoria de mayo 100X. B) Hipófisis macho 100X. C) Ovario vitelogénico D) Testículo recrudesciente con presencia de espermatozoides y espermatocitos secundarios.

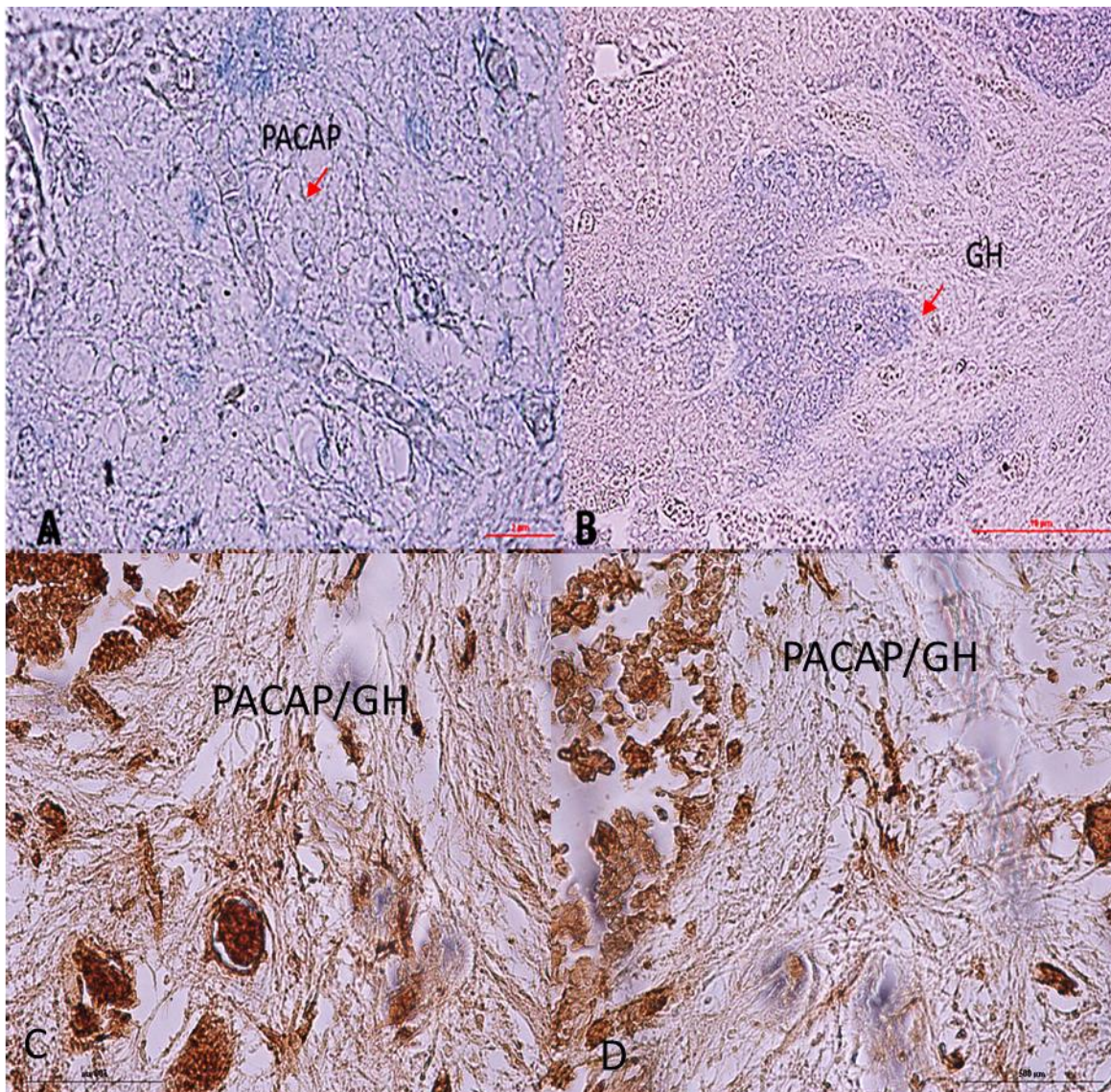


Figura. 12.- A) Hipófisis de una hembra colectada en Junio mostrando una reacción a PACAP con el kit TMB blue, la reacción se localiza en la NH. B) Reacción a GH en hipófisis de una hembra de junio, la reacción es localizada en somatotropas que rodean la NH. C y D) Doble inmunohistoquímica a GH y PACAP podemos observar la fuerte tinción que se logró obtener para las fibras de PACAP y para las células somatotropas.

Los resultados obtenidos con las pruebas estadísticas fueron los que se presentan a continuación:

Debido a que los datos de las etapas del ciclo sexual no se comportan de acuerdo a una distribución normal se decidió aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, en donde se contrastaron las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ no hay diferencias entre las etapas del ciclo sexual.

Ha: $p < 0.05$ hay diferencias entre las etapas del ciclo sexual.

Se obtuvo la siguiente tabla:

Multiple Comparisons p values (2-tailed); Var2 (Spreadsheet3) Independent (grouping) variable: Var1 Kruskal-Wallis test: H (3, N= 80) =18,07765 p =,0004				
	inmadura - R:32,200	Madura - R:56,700	Recrudesciente - R:30,300	regresión - R:42,800
inmadura		0,005136	1,000000	0,895007
Madura	0,005136		0,001964	0,351305
Recrudesciente	1,000000	0,001964		0,533619
regresión	0,895007	0,351305	0,533619	

Se puede observar que para $H(3, N=80) = 18,07765$ $p = 0,0004 < 0.05$, lo que implica que existen diferencias entre las etapas del ciclo sexual.

Al realizar la prueba de comparaciones múltiples se puede observar que:

La etapa madura es mayor a inmadura ($p=0,005136$) y a recrudesciente ($p=0,001964$)

No se observan diferencias entre las otras combinaciones.

Paquete para análisis estadístico utilizado: STATISTICA versión 10

Discusión

Este es el primer reporte sobre la colocalización del PACAP en las proximidades de las células somatotropas en la PDP en alguna especie de atherinópsidos, que es una familia importante de peces dulceacuícolas en Latinoamérica, y en particular, para especies endémicas mexicanas. Los resultados obtenidos nos permiten asegurar que en el pez *C. humboldtianum* fueron identificadas fibras inmunorreactivas a el PACAP en la periferia de la PDP, muy próximas a las células somatótropas, manteniéndose una relación de fibras positivas al PACAP/ célula somatótropa durante las diversas fases del ciclo sexual, e inclusive en animales inmaduros, lo que sugiere que el polipéptido puede ejercer un papel importante en la regulación de la GH. No obstante, se requieren estudios de índole fisiológica en esta especie que demuestren una influencia directa del PACAP en la liberación de la GH o en su defecto ubicar la expresión de receptores PAC1 en las células somatótropas.

Nuestros resultados concuerdan con estudios previos en el pez dorado (*C. auratus*) en el que, aunque filogenéticamente alejado de nuestra especie en el grupo de los teleósteos (Wong *et al.*,1998) también se localizaron fibras PACAP en la región de la PDP, utilizando una metodología similar de cortes seriados, se identificó la colocalización de las células somatotropas y el PACAP. En ese mismo reporte, se menciona la presencia de inmunorreactividad al PACAP en la cercanía de los vasos sanguíneos en el lóbulo intermedio de la hipófisis, misma circunstancia que fue encontrada en nuestra especie de estudio. Además, tanto en *Carassius auratus* como en *C. humboldtianum* se identificó inmunorreacción positiva a PACAP en la parte rostral proximal de la hipófisis (PRP). Una distribución similar a la reportada para estas dos especies fue descrita para el cerebro e hipófisis de la *Anguilla anguilla* (Montero *et al.*,1998), estableciendo que el PACAP tiene una amplia distribución en el encéfalo y en las diversas partes de la pituitaria. En *Uranoscopus japonicus* se estudió mediante doble inmunohistoquímica la relación que existe entre el PACAP y las células productoras de GH, prolactina (PRL), somatolactina (SL), péptido N terminal proopiomelanocorticotrópico (N-POMC), N-acetil endorfina II (END) y la subunidad β de la hormona gonadotropina II (GTH), describiendo que

las fibras de PACAP estaban próximas a diferentes tipos celulares que incluyen a SL, N-POMC y END (Matsuda *et al.*, 2005).

Como ya hemos mencionado, para otras especies, el PACAP estimula de forma dependiente de la concentración la liberación de GH en algunas especies de teleósteos, tal es el caso del salmón (Parker *et al.*, 1997), la anguila europea (Montero *et al.*, 1998), el pez dorado (Wong *et al.*, 1998), y en la carpa común (Xiao *et al.*, 2002). Se ha reportado también que en algunas especies el PACAP mostró ser más efectivo que otros inductores de la liberación de la hormona de crecimiento como lo son la DA. Esta sustancia es más efectiva en estimular la liberación de la GH en la etapa de regresión, muy baja en la madurez sexual e intermedia durante la recrudescencia (Wong *et al.*, 1993), mientras que la GnRH presenta su mayor actividad inductora alrededor de la madurez sexual disminuyendo de forma significativa en la regresión (Trudeau *et al.*, 1992), en ambos casos teniéndose como modelo de estudio al pez dorado. Debido a la efectividad estacional de estas sustancias, en el presente trabajo se esperaba encontrar alguna diferencia estacional debida a la etapa reproductiva en que se encontrara el ejemplar. Si bien, el conteo de fibras PACAP inmunorreactivas alrededor de las células somatotropas presenta una tendencia en las etapas finales de la gametogénesis y la madurez sexual, los valores registrados, no nos permiten afirmar que durante estas etapas de ciclo el PACAP pueda ser más efectivo en la estimulación de la secreción de GH, para poder llegar a esa conclusión serán necesarios efectuar estudios de dosis-respuesta en esta especie.

Muchas fibras PACAP se localizaron en la proximidades a células de la adenohipófisis que no fueron reactivas a la GH, esto se debe principalmente a que el PACAP es una pieza clave de muchos procesos biológicos como la alimentación, la reproducción, el crecimiento, el desarrollo, la termorregulación y la respuesta inmune (Vaudry *et al.*, 2009) esta importancia se ve reflejado en algunos estudios que describen que en cada tipo celular de la adenohipófisis está presente un tipo de receptor a PACAP (Vigh *et al.*, 1993; Rawlings *et al.*, 1996). Así mismo, el PACAP

es un factor importante en la liberación de hormonas como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante LH.

Ji y col (2011), encontraron que los niveles de mRNA del PACAP no difieren significativamente a lo largo de las etapas de crecimiento, sin embargo, en este estudio se encontró que el PACAP actúa de manera diferente dependiendo de la etapa del ciclo sexual de los organismos. Se encontraron fibras nerviosas de PACAP innervando células que no eran somatotropas, puesto que PACAP es un factor importante en la liberación de otras hormonas además de la GH, entre ellas la PRL y el POMC (Mucio-Ramírez *et al.*, 2004; Winters *et al.*, 2011), además PACAP estimula la liberación de somatolactina en cultivos de células de la hipófisis del pez dorado (Azuma *et al.*, 2013).

Por otro lado, es importante mencionar que se encontraron algunas células que parecían tener una reacción positiva al anticuerpo contra PACAP, en células de la hipófisis en el pez dorado, sugiriendo que esto se debía a una producción local del péptido (Wong *et al.*, 1998); existen estudios que corroboran esta información donde han descrito que en la hipófisis hay células productoras de PACAP que podrían actuar de manera autocrina/paracrina (Arimura *et al.*, 2006; Ghatei *et al.*, 1993). En cuanto a los vasos sanguíneos teñidos que se observaron en cortes de septiembre, algunos estudios mencionan que el PACAP es un potente vasodilatador por lo que se encuentra sobre las células endoteliales (Vaudry *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 1998).

Aunque el presente trabajo no tuvo como objetivo identificar la distribución de la GH en el cerebro se observó que había zonas, como la NPPv y el OT, en las que en varias ocasiones se observó reacción al anticuerpo contra la GH. Estas observaciones concuerdan con resultados obtenidos en hembras maduras, a través de técnicas moleculares en nuestro laboratorio (datos no publicados).

Conclusión

En la hipófisis de *C. humboldtianum* se observó co-localización de PACAP y GH. Es la primera vez que se reporta la relación que existe entre el PACAP y la GH en la hipófisis de esta especie.

Se observaron células somatotropas que se asocian con las fibras PACAP inmunopositivas que inervan la adenohipósis.

Se observaron fibras PACAP inmunopositivas en las proximidades de células no somatotropas, y por su distribución se puede sugerir que se trata de células gonadótropas y/o productoras de PRL.

Se encontró reacción a GH en la NPPv y OT del cerebro, esta reacción ya se había encontrado en el estudio anterior y queda confirmado por amplificación del ADN por la PCR en datos encontrados en el laboratorio y no reportados.

Referencias

Almuly, R., Cavari, B., Ferstman, H., Kolodny, O., & Funkenstein, B. (2000). Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding gene: identification of minisatellite polymorphism in intron I. *Genome*, 43(5), 836-845.

Aramburo, C., Carranza, M., Martinez, H., & Luna, M. (1997, November). A comparative overview of growth hormone: proteins and genes. In *Proceedings of the XIIIth International Congress of Comparative Endocrinology*, Yokohama, Japan (pp. 17-21).

Argenton, F., Vianello, S., Bernardini, S., Jacquemin, P., Martial, J., Belayew, A., ... & Bortolussi, M. (1993). The transcriptional regulation of the growth hormone gene is conserved in vertebrate evolution. *Biochemical and biophysical research communications*, 192(3), 1360-1366.

Arimura, A., Somogyvári-Vigh, A., Miyata, A., Mizuno, K., Coy, D. H., & Kitada, C. (1991). Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology*, 129(5), 2787-2789.

Barbour, C. D. (1973). A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): a species flock from the Mexican Plateau. *Copeia*, 533-556.

Basille, M., Gonzalez, B. J., Leroux, P., Jeandel, L., Fournier, A., & Vaudry, H. (1993). Localization and characterization of PACAP receptors in the rat cerebellum during development: evidence for a stimulatory effect of PACAP on immature cerebellar granule cells. *Neuroscience*, 57(2), 329-338.

Beudet, M. M., Braas, K. M., & May, V. (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) expression in sympathetic preganglionic projection neurons to the superior cervical ganglion. *Journal of neurobiology*, 36(3), 325-336.

Bernardini, S., Argenton, F., Vianello, S., Colombo, L. & Bortolussi, M. (1999). Regulatory regions in the promoter and tirad intron of the growth hormone gene in

rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *General and Comparative Endocrinology* 116: 261-271.

Björnsson, B. T. (1997). The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17(1-6), 9-24.

Blechman, J., & Levkowitz, G. (2013). Alternative splicing of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor PAC1: mechanisms of fine tuning of brain activity. *Frontiers in endocrinology*, 4, 55.

Brooks, A. J., & Waters, M. J. (2010). The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(9), 515.

Brooks, A. J., Wooh, J. W., Tunny, K. A., & Waters, M. J. (2008). Growth hormone receptor; mechanism of action. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(10), 1984-1989.

Calduch-Giner, J. A., Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., & Pérez-Sánchez, J. (1997). Growth hormone as an in vitro phagocyte-activating factor in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Cell and tissue research*, 287(3), 535-540.

Canosa, L. F., Chang, J. P., & Peter, R. E. (2007). Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 151(1), 1-26.

Cosman, D. (1993). The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine*, 5(2), 95-106.

Cowan, J. W., Wang, X., Guan, R., He, K., Jiang, J., Baumann, G., et al. (2005). Growth hormone receptor is a target for presenilin-independent gamma-secretase cleavage. *J. Biol. Chem.*, 280(19), 19331–19342.

Chavez Maldonado y Cárdenas-Reygadas. (2012). El polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) en *Chirostoma humboldtianum*. *Investigación ictiológica en México. Temas selectos en honor al Dr. José Luis Castro Aguirre*. UNAM-SIMAC, cap. 1 pp 3-11. ISBN 978-607-02-3628-0.

Cárdenas R. (2012). La hormona de crecimiento en los teleósteos. Estructura, funciones y la regulación de su secreción. Investigación ictiológica en México. Temas selectos en honor al Dr. José Luis Castro Aguirre. UNAM- SIMAC, cap. 2 pp 13-30. ISBN 978-607-02-3628-0

Ezcurra E. (1996). De las chinampas a la megápolis. El medio ambiente en la cuenca de México. Fondo de cultura económica. México D.

Farchi-Pisanty, O., Sternberg, H., & Moav, B. (1997). Transcriptional regulation of fish growth hormone gene. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17(1-6), 237-246.

Fradinger, Erica & Sherwood, Nancy. (2000). Characterization of the gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in zebrafish. *Molecular and cellular endocrinology*. 165. 211-9. 10.1016/S0303-7207(00)00251-3.

Gahete, M. D., Durán - Prado, M., Luque, R. M., Martínez - Fuentes, A. J., Quintero, A., Gutiérrez - Pascual, E., ... & Castano, J. P. (2009). Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes: lessons from comparative endocrinology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163(1), 137-153.

García-Hernández, M. P., García-Ayala, A., Elbal, M. T., & Agulleiro, B. (1996). The adenohypophysis of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810): an immunocytochemical study. *Tissue and Cell*, 28(5), 577-585.

Grauschopf, U., Lilie, H., Honold, K., Wozny, M., Reusch, D., Esswein, A., ... & Rudolph, R. (2000). The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone binding domain and reveals a distinct disulfide pattern. *Biochemistry*, 39(30), 8878-8887.

Grey, C. L., & Chang, J. P. (2013). Differential modulation of ghrelin-induced GH and LH release by PACAP and dopamine in goldfish pituitary cells. *General and comparative endocrinology*, 191, 215-224.

Hancock, M. B. (1984). Visualization of peptide-immunoreactive processes on serotonin-immunoreactive cells using two-color immunoperoxidase staining. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 32(3), 311-314.

Harmar, A. J., Fahrenkrug, J., Gozes, I., Laburthe, M., May, V., Pisegna, J. R., ... & Said, S. I. (2012). Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase - activating polypeptide: IUPHAR Review 1. *British journal of pharmacology*, 166(1), 4-17.

Harmar, AJ (2001). Familia-B Receptores acoplados a proteína G. *Genome biology*, 2 (12), reviews3013-1.

Hernández-Cervantes, Rosalía, Sánchez-Acosta, Ana Gabriela, Ramírez-Nieto, Ricardo, & Morales-Montor, Jorge. (2010). Regulación neuroendocrinológica de la función inmunitaria: el papel de la hipófisis y los esteroides sexuales. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 13(2), 103-112

Herrington, J., & Carter-Su, C. (2001). Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12(6), 252-257.

Himick, B. A., Golosinski, A. A., Jonsson, A. C., & Peter, R. E. (1993). CCK/gastrin-like immunoreactivity in the goldfish pituitary: regulation of pituitary hormone secretion by CCK-like peptides in vitro. *General and comparative endocrinology*, 92(1), 88-103.

Hosoya, M., Kimura, C., Ogi, K., Ohkubo, S., Miyamoto, Y., Kugoh, H., ... & Fujino, M. (1992). Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1129(2), 199-206.

Hull, K. L., & Harvey, S. (2001). Growth hormone: roles in female reproduction. *Journal of Endocrinology*, 168(1), 1-23.

Hyde, JF, Murai, I. y Ben-Jonathan, N. (1988). Efectos diferenciales de la sección del tallo hipofisario en los contenidos hipotalámicos e hipofisarios posteriores del factor liberador de prolactina, oxitocina, dopamina y beta-endorfina. *Neuroendocrinología* , 48 (3), 314-319.

Ji, XS, Chen, SL, Jiang, YL, Xu, TJ, Yang, JF y Tian, YS (2011). Diferencias de crecimiento y análisis de expresión diferencial del polipéptido activador de adenilato ciclasa hipofisario (PACAP) y la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) entre los sexos en la lengua de lengua semi-lisa *Cynoglossus semilaevis*. *Endocrinología general y comparativa* , 170 (1), 99-109.

Juárez-Robles, M.V. (2014). Distribución de la hormona del crecimiento en Hipófisis de *Chirostoma humboldtianum*. Tesis de licenciatura. FES- Iztacala, UNAM.

Lefkowitz, R. J. (2004). Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 25(8), 413-422.

Légrádi, G., Shioda, S., & Arimura, A. (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in autonomic regulatory areas of the rat medulla oblongata. *Neuroscience letters*, 176(2), 193-196.

Li, C. H., Evans, H. M., & Simpson, M. E. (1945). Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone. *Journal of Biological Chemistry*, 159(2), 353-366.

Loredo-Ranjel, R. (2012). Distribución del transcrito del Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria (PACAP) en el cerebro anterior de *Chirostoma Humboldtianum*. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala, UNAM.

Lugo, JM, Oliva, A., Morales, A., Reyes, O., Garay, HE, Herrera, F., ... y Estrada, MP (2010). El papel biológico del polipéptido activador de adenilato ciclasa hipofisario (PACAP) en el comportamiento de crecimiento y alimentación en peces juveniles. *Journal of Peptide Science* , 16 (11), 633-643.

Martin, B., De Maturana, RL, Brenneman, R., Walent, T., Mattson, MP y Maudsley, S. (2005). Receptores acoplados a proteínas G de clase II y sus ligandos en función y protección neuronal. *Medicina neuromolecular* , 7 (1-2), 3-36.

Martínez-Fuentes, A. J., Malagón, M. M., Castaño, J. P., Garrido-Gracia, J., & Gracia-Navarro, F. (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP27 differentially stimulate growth hormone release and mRNA accumulation in porcine somatotropes. *Life sciences*, 62(26), 2379-2390.

Martoja, R., & Martoja-Pierson, M. (1970). Técnicas de histología animal (No. QM 556. M3718 1970).

Matsuda, K., Nagano, Y., Uchiyama, M., Onoue, S., Takahashi, A., Kawauchi, H., & Shioda, S. (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactivity in the brain of a teleost, *Uranoscopus japonicus*: immunohistochemical relationship between PACAP and adenohipofisial hormones. *Regulatory peptides*, 126(1-2), 129-136.

McRory, J. E., Parker, D. B., Ngamvongchon, S., & Sherwood, N. M. (1995). Sequence and expression of cDNA for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH)-like peptide in catfish. *Molecular and cellular endocrinology*, 108(1-2), 169-177.

Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., & Yaron, Z. (1998). Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 119(3), 325-338.

Melamed, P., Eliahu, N., Ofir, M., Levavi-Sivan, B., Smal, J., Rentier-Delrue, F., & Yaron, Z. (1995). The effects of gonadal development and sex steroids on growth hormone secretion in the male tilapia hybrid (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Fish physiology and biochemistry*, 14(4), 267-277.

Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R. R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., ... & Coy, D. H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 164(1), 567-574.

Moller M, Fahrenkrug J, Hannibal J. (1999). Innervation of the rat pineal gland by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-immunoreactive nerve fibres. *Cell Tissue Res*, 296(2):247-57.

Montero, M., Yon, L., Rousseau, K., Arimura, A., Fournier, A., Dufour, S., & Vaudry, H. (1998). Distribution, characterization, and growth hormone-releasing activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Endocrinology*, 139(10), 4300-4310.

Mucio-Ramírez, S., Miller-Pérez, C., Curras-Collazo, M., & León-Olea, M. (2004). El polipéptido activador de la adenilato ciclase de la pituitaria (PACAP): actualización de conocimientos. *Salud Mental*, 27(2), 55-69.

Nelson, L. E., & Sheridan, M. A. (2005). Regulation of somatostatins and their receptors in fish. *General and comparative endocrinology*, 142(1-2), 117-133.

Pankova, M. V., Brykov, V. A., Pankova, V. V., & Atopkin, D. M. (2013). Fish growth hormone genes: Divergence of intron sequence in charrs of *Salvelinus* genus. *Russian journal of genetics*, 49(6), 645-651.

Parker, D. B., Power, M. E., Swanson, P., Rivier, J., & Sherwood, N. M. (1997). Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release. *Endocrinology*, 138(1), 414-423..

Parker, D. B., Coe, I. R., Dixon, G. H., & Sherwood, N. M. (1993). Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily. *European Journal of Biochemistry*, 215(2), 439-448.

Peng, C., & Peter, R. E. (1997). Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish. *Zoological Studies-Taipei*, 36, 79-89.

Peng, C., Huang, Y. P., & Peter, R. E. (1990). Neuropeptide Y stimulates growth hormone and gonadotropin release from the goldfish pituitary in vitro. *Neuroendocrinology*, 52(1), 28-34.

Peter, R. E., & Chang, J. P. (1999). Brain regulation of growth hormone secretion and food intake in fish. In *Neural regulation in the vertebrate endocrine system* (pp. 55-67). Springer, Boston, MA.

Peter, R. E., & Marchant, T. A. (1995). The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture*, 129(1-4), 299-321.

Rawlings, S. R. (1994). PACAP, PACAP receptors, and intracellular signalling. *Molecular and cellular endocrinology*, 101(1-2), C5-C9.

Reglödi, D., Lengvari, I., Szelier, M., Vigh, S., & Arimura, A. (2000). Distribution of PACAP-like immunoreactivity in the nervous system of oligochaeta ☆. *Peptides*, 21(2), 183-188.

Ridderstrale, M., & Tornqvist, H. (1994). PI-3-kinase inhibitor wortmannin blocks the insulin-like effects of growth hormone in isolated rat adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 203(1), 306-310..

Roby, K. F., Deb, S., Gibori, G., Szpirer, C., Levan, G., Kwok, S. C., & Soares, M. J. (1993). Decidual prolactin-related protein. Identification, molecular cloning, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 268(5), 3136-3142.

Rojas, C. P.M. (2005). El pescado blanco. Revista digital universitaria. Volumen 6.

Rojas, C.M.P. (2006). Reproductive aspects of “Charal prieto” *Chirostoma attenuatum* (meek,1902) of lake Patzcuaro, Michoacán. New topics on Atherinopsids of Mexico. *Hidrobiológica* 16.1: 1-9

Rosas, M. M. (1976). Peces dulceacuícolas que se explotan en México y datos sobre su cultivo. Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo AC Instituto Nacional de Pesca.

Rousseau, K., Le Belle, N., Marchelidon, J., Dufour, S., (1999). Evidence that corticotrophin-releasing hormone acts as a growth hormone-releasing factor in a primitive teleost, the European eel (*Anguilla anguilla*). *J. Neuroendocrinol.* 11, 385–392

Sherwood, N. M., Krueckl, S. L., & McRory, J. E. (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine reviews*, 21(6), 619-670.

StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.

Sternberg, H. & Moav, B. (1999). Regulation of the growth hormone gene by fish thyroid/retinol receptors. *Fish Physiology and Biochemistry* 20: 331 -339

Theill, L. E., and Karin, M. (1993). Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. *Endocr. Rev.* 14, 670–689

Unniappan, S., Peter, R.E., (2005). Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in Wsh. *Comp. Biochem. Physiol.* 140A, 396–408

van Kerkhof, P., Putters, J., & Strous, G. J. (2007). The ubiquitin ligase SCF (β TrCP) regulates the degradation of the growth hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20475-20483.

VanderKuur, J. A., Butch, E. R., Waters, S. B., Pessin, J. E., Guan, K. L., & Carter-Su, C. (1997). Signaling molecules involved in coupling growth hormone receptor to mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, 138(10), 4301-4307.

Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., ... & Vaudry, H. (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological reviews*, 61(3), 283-357.

Vaudry, D., Gonzalez, B. J., Basille, M., Pamantung, T. F., Fontaine, M., Fournier, A., & Vaudry, H. (2000, January). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) promotes cerebellar granule cell survival through inhibition caspase-3 activity. In *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE* (Vol. 12, pp. 62-62). PO BOX 88, OSNEY MEAD, OXFORD OX2 0NE, OXON, ENGLAND: BLACKWELL SCIENCE LTD..

Villaplana, M., García Ayala, A., Hernández, M. P. G., & Agulleiro, B. (2003). Immunocytochemical and ultrastructural characterization of mammosomatotrope - , growth hormone - , and prolactin - cells from the gilthead sea bream (*sparus aurata* L., teleostei): an ontogenic study. *Journal of morphology*, 255(3), 347-357.

Waters, M.J., C.A. Shang, S.N. Behncken, S.P. Tam, H. Li, B. Shen & P.E. Lobie. (1999). Growth hormone as cytokine. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 26: 760-764.

Winters, S. J., & Moore Jr, J. P. (2011). PACAP, an autocrine/paracrine regulator of gonadotrophs. *Biology of reproduction*, 84(5), 844-850.

Wong, A. O. L., Leung, M. Y., Shea, W. L. C., Tse, L. Y., Chang, J. P., & Chow, B. K. C. (1998). Hypophysiotropic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: immunohistochemical demonstration of PACAP in the pituitary, PACAP stimulation of growth hormone release from pituitary cells, and molecular cloning of pituitary type I PACAP receptor. *Endocrinology*, 139(8), 3465-3479.

Wong, A. O., Li, W., Leung, C. Y., Huo, L., & Zhou, H. (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp. I. Functional coupling of cyclic adenosine 3' , 5' -monophosphate and Ca²⁺/calmodulin-dependent signaling pathways in PACAP-induced GH secretion and GH gene expression in grass carp pituitary cells. *Endocrinology*, 146(12), 5407-5424.

Xiao, D., Chu, M. M., Lee, E. K., Lin, H. R., & Wong, A. O. (2002). Regulation of growth hormone release in common carp pituitary cells by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: signal transduction involves cAMP-and calcium-dependent mechanisms. *Neuroendocrinology*, 76(5), 325-338.

Zhou, H., Ko, W. K., Ho, W. K., Stojilkovic, S. S., & Wong, A. O. (2004). Novel aspects of growth hormone (GH) autoregulation: GH-induced GH gene expression in grass carp pituitary cells through autocrine/paracrine mechanisms. *Endocrinology*, 145(10), 4615-4628.

Sze, K. H., Zhou, H., Yang, Y., He, M., Jiang, Y., & Wong, A. O. (2007). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: II. Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. *Endocrinology*, 148(10), 5042-5059.