



Universidad Nacional Autónoma  
de México

CAMPUS IZTACALA

**“EFECTO DE LA RESERPINA EN LA  
ESPERMATOGENESIS DE CARPA COMUN,  
Cyprinus carpio.”**

**TESIS PROFESIONAL**

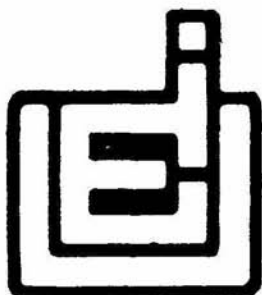
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A

**MARIA DEL ROCIO GARCIA BORES**

Dir. de Tesis: BIOL. RODOLFO GARDENAS REYGADAS

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1994





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.

A ti Señor, por siempre guiar mi camino y darle sentido a mi vida, siendo mi modelo a seguir.

A toda mi familia, en especial a mis padres por todo el apoyo y comprensión que me han brindado durante toda mi vida, ya que sin ustedes no podría haber tenido tantas cosas tan bellas.

Al Biól. Rodolfo Cárdenas Reygadas, por su asesoramiento, su amistad y apoyo, tanto en la elaboración de este trabajo como en todos los aspectos de mi vida.

Al Biól. José del Carmen Benítez y a la Biól. Carmen Alvarez, por su amistad y esmero en la revisión de este trabajo.

A todas las personas que laboran en el Bioterio, por su apoyo durante la realización del trabajo experimental.

Al Dr. Cervantes y a las personas que me ayudaron en el Laboratorio de Anatomía de la UMF para la realización de los ensayos previos a este trabajo.

A Rosario, Lety, Paco y Lilian, que me brindaron su apoyo y amistad en el Laboratorio de Histología de la UMF.

A ti mamá, por ayudarme en la revisión de este trabajo.

A ti papá, que con su apoyo y comprensión hizo posible la realización de éste trabajo.

A mis hermanos que me ayudaron cuando más lo necesitaba.

A Javier, por que con su amor y motivación participo para que concluyera este trabajo.

A mis amigos, por su apoyo y participación.

A todas las personas que de una u otra manera, participaron en la elaboración de este trabajo.

## **I N D I C E**

Introducción.....	1
Objetivo.....	21
Metodología.....	22
Resultados.....	25
Discusión .....	37
Conclusiones.....	42
Apéndice .....	43
Bibliografía.....	44

## INTRODUCCION

El cultivo de peces es una actividad importante en muchos países incluyendo México. Esto ha originado innumerables investigaciones en el campo de la reproducción y alimentación en peces. En lo que respecta a la reproducción inducida se han desarrollado diversas metodologías, como son: La administración de extractos hipofisiarios de mamífero, de extractos de hipófisis de pez o de hormonas purificadas de pez.

Las dos primeras técnicas tienen gran cantidad de inconvenientes como son que muchos peces no responden ante una hormona de mamífero como es el caso del pez gato, el salmón amago o el pez dorado (Ramírez, 1993), además de que se administran otras hormonas que afectan al organismo.

La tercer práctica es muy apropiada, tiene buenos resultados, (Ramírez, 1993) pero tiene el inconveniente de ser costosa ya que las hormonas son importadas y además se necesita gran cantidad de hipófisis para obtener una cantidad significativa de hormona.

Estudios con fármacos antidopaminérgicos han demostrado ser efectivos para estimular la espermiación y la ovulación en diversas especies de peces teleósteos (Peter, 1985); tienen la ventaja de que con dosis pequeñas se obtiene respuestas similares que con los extractos hipofisiarios u hormonas aisladas de pez, sobre todo si se administran junto con un análogo de hormona liberadora de gonadotropina.

## REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA REPRODUCCION EN TELEOSTEOS

El eje hipotálamo-hipófisis-gónada es de gran importancia en la regulación de la reproducción en vertebrados, la secreción de hormonas de estos órganos tiene una influencia recíproca hacia ellos mismos, ya que el hipotálamo produce neurohormonas que controlan a la hipófisis, la que influye a su vez en la madurez y crecimiento de las gónadas, las cuales secretan entonces a los esteroides sexuales que tienen un efecto en los tres órganos de dicho eje, de manera que existe un complejo sistema de retroalimentación que al ser alterado en algún punto tiene, como consecuencia, una influencia directa en todo el sistema. (Leeson, 1989).

### EL HIPOTALAMO

El hipotálamo está situado en la región ventral del diencefalo. Es una zona importante para el paso de la información a través de las células neurosecretoras desde el cerebro hasta el sistema hormonal. Los cuerpos de estas células, perfectamente diferenciados forman grupos independientes o núcleos; sus axones, que están en estrecho contacto con la adenohipófisis, forman lo que se conoce con el nombre de neurohipófisis (Leeson, 1989).

#### Actividad De GnRH y Sus Análogos

Todos los vertebrados no mamíferos, así como los mamíferos marsupiales tienen dos o más formas de hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH). En teleósteos el hipotálamo secreta dos formas moleculares de GnRH, la llamada de salmón (sGnRH; [Trp7, Leu8]<sub>m</sub>-GnRH) y la GnRH de pollo II (cGnRH-II; [His5, Trp7,

Tyr8]m-GnRH). Ambas estimulan la liberación tanto de gonadotropinas (GtHs) como de la hormona de crecimiento (GH) por parte de la hipófisis (Huang, 1991).

Habibi y col. (1992) realizaron una investigación con cinco formas conocidas de GnRH de vertebrados que fueron cGnRH-I y II, sGnRH, lGnRH (de lamprea) y mGnRH (de mamífero), así como análogos de mamífero (mGnRH-A) con variantes en los residuos en las posiciones 5, 7 y 8 en terminales de unión al receptor, midiendo la liberación de GH y GtH de fragmentos de hipófisis en cultivos *in vitro* en perfusión en pez dorado. Los cinco péptidos de GnRH estimularon la secreción de las hormonas antes mencionadas de manera dosis-dependiente, pero sus potenciales de acción fueron muy diferentes.

El péptido cGnRH-II fué más activo que sGnRH en la liberación de GtH, pero para la liberación de GH fué lo contrario. Los cGnRH-I y lGnRH fueron significativamente menos potentes que mGnRH, sGnRH y cGnRH-II en la liberación de GtH (Habibi, 1992).

Se han realizado estudios que relacionan la estructura y la actividad de estos péptidos observando que la posición 6, con D-aminoácidos en péptidos análogos puede proporcionar resistencia a la degradación, además de incrementar su potencial en pez dorado (Peter, 1991). La resistencia a la degradación enzimática es ciertamente uno de los factores que influyen la velocidad de liquidación metabólica. La presencia y afinidad de péptidos de



GnRH unidos a proteínas séricas ayuda a la lenta degradación de estos péptidos en circulación (Huang, 1991)

La actividad de diferentes análogos de sGnRH y mGnRH ha sido estudiada en pez dorado, de tal manera que el análogo que resultó ser más activo fué el llamado sGnRH-A, [D-Arg6, Pro9-NEt]-sGnRH, (Peter, 1985) tanto *in vivo* como *in vitro* (Habibi, 1989b).

Otro factor importante en la potencialidad de los análogos de GnRH es la afinidad (probabilidad de que una sustancia se una a su receptor) y capacidad (número de receptores a dicha sustancia) que tienen a los receptores de las células hipofisiarias (Habibi, 1991).

Los análogos de sGnRH han mostrado una fuerte correlación entre sitios de unión de alta afinidad y potencial de actividad de liberación de GtH en perfusiones de fragmentos de hipófisis (Habibi, 1990).

#### LA HIPOFISIS

La hipófisis se localiza en la base del diencéfalo, por detrás del quiasma óptico y por delante del saco vascular. Se encuentra en todos los vertebrados y está unida estrechamente al hipotálamo. (Ham, 1985). La glándula hipófisis regula por medio de sus secreciones, de manera directa o indirecta prácticamente cualquier proceso fisiológico. Esta glándula es un sitio de síntesis, almacenamiento y liberación de varias hormonas peptídicas (Espinosa, 1987). A través de sus secreciones se constituye en un transductor que permite que el sistema nervioso central controle muchas funciones endócrinas,

como las que se llevan a cabo durante el proceso reproductivo (Espinosa, 1987).

La hipófisis tiene un origen embrionario doble: una evaginación ectodérmica (Bolsa de Rathke) del techo de la cavidad bucal embrionaria, que origina a la adenohipófisis, y una invaginación del proceso ventral del diencéfalo, que forma la neurohipófisis (Leeson, 1989).

La adenohipófisis de teleósteos tiene tres regiones distintas, la parte rostral de la pars distalis (RPD), la parte proximal de dicha pars (PPD) y el lóbulo neurointermedio (NL), constituido de la parte intermedia. La RPD contiene células lactótropas; las células corticotropas se encuentran sólo en el borde entre RPD y PPD. Las tirótropas en muchos teleósteos están repartidas en el RPD, pero pueden encontrarse también entre RPD y PPD, en el cuerpo de ambas partes o sólo en PPD; esta última parte contiene principalmente células gonadótropas y somatótropas (Omeljaniuk, 1989).

En algunas especies la adenohipófisis está directamente inervada por los axones de las neuronas secretoras del hipotálamo, depositando así a las neurohormonas producidas por éstas células, directamente sobre la adenohipófisis, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, donde existe un sistema portahipofisiario. En las especies de peces teleósteos en que se presenta, es vestigial (Omeljaniuk, 1987).

Las fibras inmunorreactivas a hormonas liberadoras de

gonadotropinas (GnRH) fueron localizadas principalmente en el PPD, donde se encuentran las células gonadótropas, y algunas fibras fueron detectadas en el lóbulo neurointermedio. (Peter, 1990).

#### Gonadotropinas en Peces Teleósteos

En teleósteos existen dos tipos de GtHs. La mayor parte de los investigadores han aislado sólo una, designada como maduracional, la cual es homóloga a la hormona luteinizante (LH) y a la hormona folículo estimulante (FSH) de tetrápodos; pero una segunda GtH, llamada vitelogénica, ha sido aislada en algunas especies de teleósteos como trucha arcoiris, salmón chum, salmón amago, carpa común etc., ésta hormona no parece ser químicamente homóloga a las hormonas LH o FSH. Más recientemente, la identificación definitiva de las dos GtHs químicamente distintas, designadas GtH I y GtH II fué realizada por Kawauchi et al (1989). Aunque ambas hormonas tienen actividad similar, los niveles en hipófisis son distintos en la etapa reproductiva (Nozaki, et al, 1990).

Nozaki y colaboradores (1990) demostraron por técnicas inmunocitoquímicas que existen dos células gonadótropas distintas cada una de las cuales secretan a su vez a las diferentes GtHs encontradas en teleósteos.

#### EL TESTICULO

En la mayoría de los teleósteos, los testículos son dos órganos alargados y unidos por la pared dorsal de la cavidad corporal. El espermiducto sale de la superficie medio dorsal

posterior de cada testículo y desemboca en la papila urogenital, situada entre el recto y los ductos urinarios (Espinosa, 1987).

Según las especies la estructura testicular varía, pero los dos tipos más comunes son lobular y tubular (Túbulo-cístico). En ciprínidos, como es el caso de la carpa común, existe un arreglo testicular túbulo-cístico, es decir, presenta túbulos seminíferos (tubos de diámetro pequeño que contienen en su interior a las células germinales) con cistos, que son grupos de células de los diferentes estadios de la espermatogénesis delimitados por una pequeña capa de tejido conectivo (Espinosa, 1987)

El testículo se puede dividir en dos regiones principales, una germinal y una de tejido intersticial (Espinosa, 1987).

Región germinal.- En ésta se encuentran los siguientes tipos celulares:

1)Espermatogonias. Están situadas en la parte basal del túbulo y están separadas de la membrana basal mediante células homólogas a las de Sertoli. Se pueden encontrar varios tipos de espermatogonias, las últimas de éstas forman cistos. Son células diploides que se dividen por mitosis. Son acidófilas, su núcleo se tiñe de diversas tonalidades dependiendo del tipo de espermatogonia.

2)Espermatocitos primarios (E1). Son las células de mayor tamaño, están agrupadas en cistos, son células diploides en su origen, pero en ellas ocurre la meiosis I, por lo que, dependiendo de la etapa de la profase I en que se encuentren, pueden tener núcleos de aspectos diferentes, pero básicamente se observan basófilos y

poseen citoplasma de coloración pálida.

3) Espermátocitos secundarios (E2). Son células pequeñas, con alrededor de la mitad de volumen de los E1, son haploides, están acomodadas en cistos donde ocurre la meiosis II y por consiguiente es difícil observarlas ya que están en la etapa más rápida de la espermatogénesis.

4) Espermátides. Se originan de la división del estadio anterior, son células que sufren un proceso de transformación para dar origen a los espermatozoides a partir de un proceso llamado espermiogénesis. Cabe señalar que a microscopía óptica es difícil reconocer este estadio celular.

5) Espermatozoides. Son las células maduras de la espermatogénesis, se encuentran en el lumen del túbulo seminífero, carecen de acrosoma debido, al parecer, por la presencia de micrópilo en los ovocitos; tienen flagelo, una pieza media, cuello y cabeza.

6) Células somáticas. Están separadas de los fibroblastos por la membrana del túbulo seminífero y está en estrecho contacto con los elementos de las células germinales. Cabe mencionar que éstas células prácticamente no se aprecian en microscopía electrónica.

Región intersticial.- Se encuentran fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos y células intersticiales o de Leydig, (Figura 1) las cuales tienen una función endócrina, ya que secretan los esteroides sexuales.

Los testículos están rodeados por una capa delgada fibrosa o capa albugínea. Esta capa sufre variaciones con el ciclo sexual, siendo más delgada durante la madurez y más gruesa durante el reposo gonádico (Espinosa, 1987).

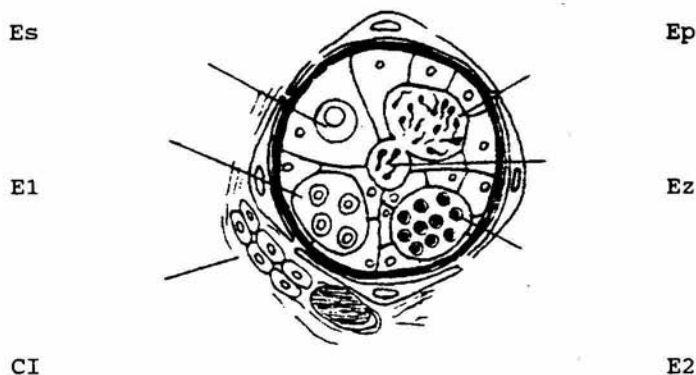


Fig. 1: Esquema que muestra el arreglo de un túbulo seminífero de pez teleosteo con arreglo túbulo cístico donde se observa: Espermatogonias (Es), espermatoцитos primarios (E1), espermatoцитos secundarios (E2), espermátides (Ep), espermatozoides (Ez), células intersticiales (CI) (Espinosa, 1987).

El control neuroendócrino es fundamental para la reproducción en vertebrados, ya que se encarga de la captación de estímulos del medio, así como de su transducción a impulsos bioeléctricos y hormonales. (Espinosa, 1987). Este control es realizado por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, el cual regula el proceso hormonal de la reproducción, donde las hormonas secretadas por la glándula hipófisis o pituitaria juegan un papel muy complejo.

## Influencia De Dopamina y Otras Catecolaminas en la Liberación de GtH en Peces Teleósteos

La influencia de las catecolaminas en la liberación de hormonas en hembras de pez dorado fueron estudiados por Chang, et al en 1985. Tratamientos *in vivo* con L-dopa, dopamina y apomorfina causaron un incremento en los niveles de hormona del crecimiento en sangre. Con inyecciones intraperitoneales de drogas que bloquean la síntesis de catecolaminas y con norepinefrina causaron un decremento en los niveles de dicha hormona. La dopamina y la apomorfina pueden estimular la liberación de GH, dichos efectos fueron bloqueados por perfusión continua con metoclofamida, un inhibidor específico de los receptores tipo 1 (D1) de la dopamina que se encuentran en el hipotálamo.

Los efectos estimulatorios de norepinefrina en la liberación de GnRH fueron estudiados en otras investigaciones: al tratar ejemplares de pez dorado con dietilditio carbamato (DDC), fármaco que bloquea la conversión de dopamina a norepinefrina, causa un decremento significativo en los niveles de GnRH en el telencéfalo y el hipotálamo. Tratamientos con el mismo pez con  $\alpha$ -metil-para-tirosina ( $\alpha$ MPT), que bloquea la conversión de tirosina a L-Dopa y consecuentemente la síntesis de catecolaminas, causaron un incremento significativo de GnRH sólo en el bulbo olfatorio (Peter, 1990).

En muchos teleósteos como pez dorado, salmón, trucha

arcoiris, carpa común, pez gato africano, etc. la dopamina tiene un efecto directo en las células gonadotropas al inhibir la estimulación de las GnRH para liberar GtH (Peter, 1990). Estos efectos inhibitorios son efectivos a los pocos segundos de exposición de dichas células a dopamina o a su agonista, apomorfina. La dopamina también influye por afectar la capacidad al receptor de GnRH.

Se ha observado que en las épocas de recrudescencia y regresión gonadal existe una disminución de la capacidad de la hipófisis de pez dorado (Peter, 1991). Además, se ha visto que el número de receptores también puede incrementarse y después bajar en respuesta a una exposición prolongada a GnRH. (Omeljaniuk, 1989a).

El incremento de dopamina hace decrecer la capacidad del receptor a GnRH y proporciona un medio para alargar el periodo de influencia de dopamina sobre las células gonadotropas (Peter, 1991).

#### Otras Sustancias que Afectan la Síntesis de GtH

-El calcio:

En pez dorado, experimentos con cultivos estáticos de células dispersas provenientes de la hipófisis, han demostrado la necesidad de calcio intracelular ((Ca)<sub>i</sub>) para la liberación de GtH, pues cuando se adiciona el ionóforo A 23187 se incrementa la liberación de GtH al medio, mientras que la carencia de calcio extracelular ((Ca)<sub>e</sub>) en el medio reduce la liberación de GtH aún en presencia tanto del ionóforo como de análogos de hormonas liberadoras. Estas hormonas incrementan los niveles de calcio



intracelular en células de la pituitaria de pez dorado, siendo por ello, dependientes de ((Ca)e). (Chang, 1993).

- El Adenosin Monofosfato Cíclico (AMPC):

En experimentos similares, la activación de adenil ciclasa por foskolin incrementa la liberación de AMPC y la estimulación de la secreción de GtH. La adición de análogos de AMPC, como 8 bromoadenosina 3':5' monofosfato cíclico (8Br-AMPC), y dibutiril AMPC también incrementaron la liberación de GtH, sugiriendo que la elevación de los niveles de AMPC pueden inducir la secreción de GtH (Chang, 1992).

-El Acido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA):

Existe una abundante inervación en la hipófisis de pez dorado que muestra gran cantidad de fibras inmunopositivas a Acido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), la cual sugiere una posible función neuroendócrina. Inyecciones de este neurotransmisor causan un incremento en los niveles de GtH en suero, pero no ocurre lo mismo en células dispersas de hipófisis en perfusión o en cultivo estático. Sin embargo, tiene un efecto estimulatorio en la liberación de GnRH en terminales que inervan a la pituitaria, lo cual explica el efecto estimulatorio en la liberación de GtH. (Kah, 1992).

-Esteroides Sexuales:

En tratamientos realizados a peces con regresión sexual y recrudescencia gonádica con estradiol, se reducen las concentraciones de GABA en cerebro y se suprimen sus efectos estimulantes en la liberación de GnRH de fragmentos de hipófisis en pez dorado **in vitro** (Kah, 1992). Estos efectos inhibitorios del

estradiol sobre GABA pueden ser parte del mecanismo de retroalimentación negativo de estrógenos en el eje hipófisis-cerebro en el pez dorado (Peter, 1991). Tratamientos en dicho pez con estradiol o testosterona causaron un incremento en la velocidad del cambio de dopamina en la región del telencéfalo específicamente en el área preóptica, en el cerebro y la hipófisis. Esto sugiere que los esteroides sexuales pueden incrementar la magnitud de inhibición de la dopamina en la liberación de GnRH y GtH (Huang, 1991).

En teleósteos sexualmente inmaduros, los esteroides sexuales parecen tener en efecto de retroalimentación positiva, ya que se ha observado que el contenido de GtH en la hipófisis de machos y hembras se incrementa al ser tratados con testosterona (Crim, 1981). Si este efecto de retroalimentación positivo de esteroides sexuales es una parte de los mecanismos de la pubertad, no es aún bien conocido. Sin embargo, en tratamientos prolongados de testosterona en la misma especie se pudo detectar GtH en plasma y desarrollo gonadal iniciado, indicando que el eje gónada-cerebro-hipófisis ha sido funcional (Crim, 1983).

Este efecto de retroalimentación positiva de testosterona en el eje del cerebro-hipófisis depende de la aromatización de andrógenos a estrógenos. Sin embargo, la aplicación de una dosis similar de estradiol incrementa la respuesta sólo en hembras en regresión sexual y post-reproductivas, y sólo una dosis cuatro veces mayor fué efectiva en hembras con recrudescencia ovárica tardía. Así, este efecto de retroalimentación positiva de esteroides sexuales es una parte natural de la acción de los

dichas hormonas, y ambos, tanto el negativo como el positivo, coexisten en un balance (Trudeau, 1991).

-Serotonina:

Inyecciones de serotonina en pez dorado causan un incremento en los niveles de suero de GtH, siendo mayor la respuesta en hembras y machos pre-reproductivos. Estos efectos fueron bloqueados con un antagonista al receptor de serotonina (ketanserina) (Somoza, 1991).

El efecto directo de la serotonina en las células gonadótropas no es conocida, pero estimula la liberación de GnRH en fragmentos de hipófisis, indicando que esto puede ser una parte del mecanismo de su estimulación para la liberación de GtH (Yu, 1991b).

-Neuropéptido Y (NPY):

Existen fibras inmunopositivas al neuropéptido Y (NPY) en estrecha relación con las gonadótropas en pez dorado, que sugieren una función neuroendócrina. La perfusión de fragmentos de hipófisis de peces en etapa de recrudescencia sexual tienen una mayor magnitud de respuesta a NPY que los peces en regresión, lo que indica que existe una respuesta en la variación sensorial (Peter, 1991).

En trucha arcoiris, NPY tiene un efecto estimulatorio en la liberación de GtH de hembras maduras, pero tuvo un efecto inhibitorio en hembras en recrudescencia (vitelogénicas) (Peter, 1991).

El NPY estimula directamente la liberación de GtH en células dispersas de hipófisis de pez dorado, sin embargo, un efecto estimulador en la liberación de GnRH es también posible (Peng, 1990).

**-Opioides Endógenos:**

Los péptidos opioides endógenos también influyen sobre la secreción de GtH. Tratamientos en pez dorado con largos estadíos de recrudescencia gonadal, con el antagonista a opiodes, naloxona, causó una disminución en el nivel de GtH en suero y en su respuesta a LHRH-A (análogo de la hormona liberadora de LH), sin embargo, en peces en recrudescencia gonádica temprana este antagonista tiene un efecto contrario cuando es dado solo o con LHRH-A; además potencializa la respuesta al antagonista de dopamina, domperidona. Los mecanismos por los cuales actúan los opioides endógenos con las células gonodotropas no son conocidos (Roseblum, 1989).

**-Aminoácido Taurina:**

Inyecciones en pez dorado con el neurotransmisor aminoácido taurina, causan un incremento en los niveles de GtH en suero. La síntesis de catecolamina  $\alpha$ -metil-p-tyrosina causan una disminución en las concentraciones de dopamina en hipófisis y potencializa los efectos de taurina en los niveles de GtH sérica, por lo que se piensa que este aminoácido puede actuar modulando los efectos inhibitorios de dopamina en la liberación de GtH (Peter, 1991).

**-Feromonas:**

En los machos de pez dorado, cuando acompañan a hembras que realizan ovulación, se ha notado un incremento en los niveles de

GtH en sangre después de 12 horas en respuesta a las feromonas secretadas por las hembras, específicamente el esteroide del ovocito  $17\alpha$ ,  $20\beta$  dihidroxy-4-pregnon-3-1 y la prostaglandina- $F2\alpha$  (Dulka,1992).

#### ESTUDIOS REALIZADOS CON ANTIDOPAMINERGICOS Y ANALOGOS DE GnRH

Omeljaniuk y colaboradores reportaron en 1989 que al inyectar domperidona, un antagonista de dopamina que actúa sobre receptor  $D2$ , se ocasiona un incremento en la capacidad del receptor a GnRH en la hipófisis de pez dorado después de 24 horas. De Leeuw (1989) demostró la dependencia dosis-tiempo de este efecto en los receptores a GnRH en la hipófisis de dicha especie.

En estudios con perca y pez dorado también ha sido demostrado que otras drogas que bloquean la síntesis de dopamina como espiperona, pimozida, y metocloramida (Omeljaniuk, et al, 1989; Sokolowska, et al,1988; Peter, et al, 1988 ) o que depletan a las catecolaminas como la reserpina (Sokolowska, et al 1988; Ahikam, et al, 1991) afectan directamente a las células gonadótropas ya que causan un incremento en la capacidad del receptor a GnRH. Con esas bases el uso de los antagonistas de la dopamina en combinación con análogos de GnRH, han mostrado ser medios muy efectivos para la inducción de espermiación y ovulación en diversas especies (Chang and Peter, 1983; Chang et al, 1984; Sokolowska et al, 1985b; Peter et al 1988).

Sokolowska y colaboradores en 1988 analizaron los efectos de la reserpina combinada con análogos de GnRH en la espermiación de

carpa común (Cyprinus carpio). Dicho estudio mostró que este fármaco inyectado intraperitonealmente en una dosis de 1mg/Kg incrementó los niveles de gonadotropina en plasma, manteniéndose sin diferencia significativa durante 48 horas después de la inyección. También se observó un incremento en el volumen de espermatozoides de aproximadamente el 200% de lo que tenían al tiempo de la inyección en comparación con el grupo control. Cuando en el mismo trabajo se inyectó reserpina combinada con análogos de GnRH, se obtuvieron niveles mucho mayores que cuando se inyectó reserpina sola, aunque su presencia en suero fué más prolongada.

#### LA RESERPINA

La reserpina es obtenida de la raíz de algunas especies de Rauwolfia, principalmente de Rauwolfia serpentina. La reserpina es un polvo cristalino y blanquecino, difícilmente soluble en agua pero soluble en ácidos orgánicos como el ácido cítrico. Es un alcaloide indólico terciario que tiene los siguientes mecanismos de acción:

La reserpina libera varias aminas biógenas del cerebro y otros sitios periféricos, también provoca el agotamiento de noradrenalina, adrenalina y dopamina (catecolaminas) de diferentes tejidos (Drill, 1978).

La reserpina agota las reservas de catecolaminas, la aplicación de ésta en dosis repetidas genera decrementos en la concentración de catecolaminas una hora después de que fué aplicada y su efecto máximo es a las 24 hrs tanto en mamíferos (Goodman, et al 1986) como en peces (Chang, 1983). La disminución

de la síntesis de norepinefrina inducida por la reserpina puede deberse al bloqueo de la captación de dopamina por los gránulos de almacenamiento que contienen la enzima dopamina beta-hidroxilasa.

Las catecolaminas de los tejidos se restauran lentamente, por lo tanto, las dosis repetidas tienen acción acumulativa cuando se dan durante una semana o más.

La administración crónica de reserpina en dosis menores de 1 mg por día produce marcada depleción del contenido de norepinefrina del miocardio humano (Rodríguez, 1984).

En presencia de concentración suficiente de dopamina, la reserpina *in vitro* no obstaculiza la síntesis de noradrenalina y adrenalina, ni la seratonina. Algunos farmacólogos han argumentado que, si bien disminuye la concentración total de aminas cerebrales, las aminas libres no menguan, y que los efectos del sistema nervioso central dependen de la concentración de aminas libres en el sitio receptor. Se ha podido comprobar que la depresión del sistema nervioso central se correlaciona mejor con la disminución de la concentración de catecolaminas cerebrales. (Goodman, et al, 1986).

En el trabajo ya mencionado de Sokolowska (1988), se muestra que la reserpina sola estimula la espermiación de carpa, mientras que Billard en 1983 demostró que pimozida, un fármaco antagonista de la dopamina que tiene el mejor efecto combinado con análogos (Ahikam, 1991), no fué efectivo en la inducción de la liberación de GtH ni en la espermiación en carpa. Esto es notable porque

muestra que la reserpina es realmente una buena opción además de ser un fármaco accesible y responde también al ser utilizado con análogos de GnRH.

Un modelo del sistema neuroendócrino de la secreción de GtH es representado en la figura 2. Este modelo no es definitivo, ya que hace falta aún investigar muchos aspectos de la regulación neuroendócrina de la secreción de GtH, pero permite comprender como ocurre la relación entre las secreciones de hormonas en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. También se muestra la influencia de la reserpina en el proceso. ( Peter, 1991 y Cárdenas, datos no publicados).



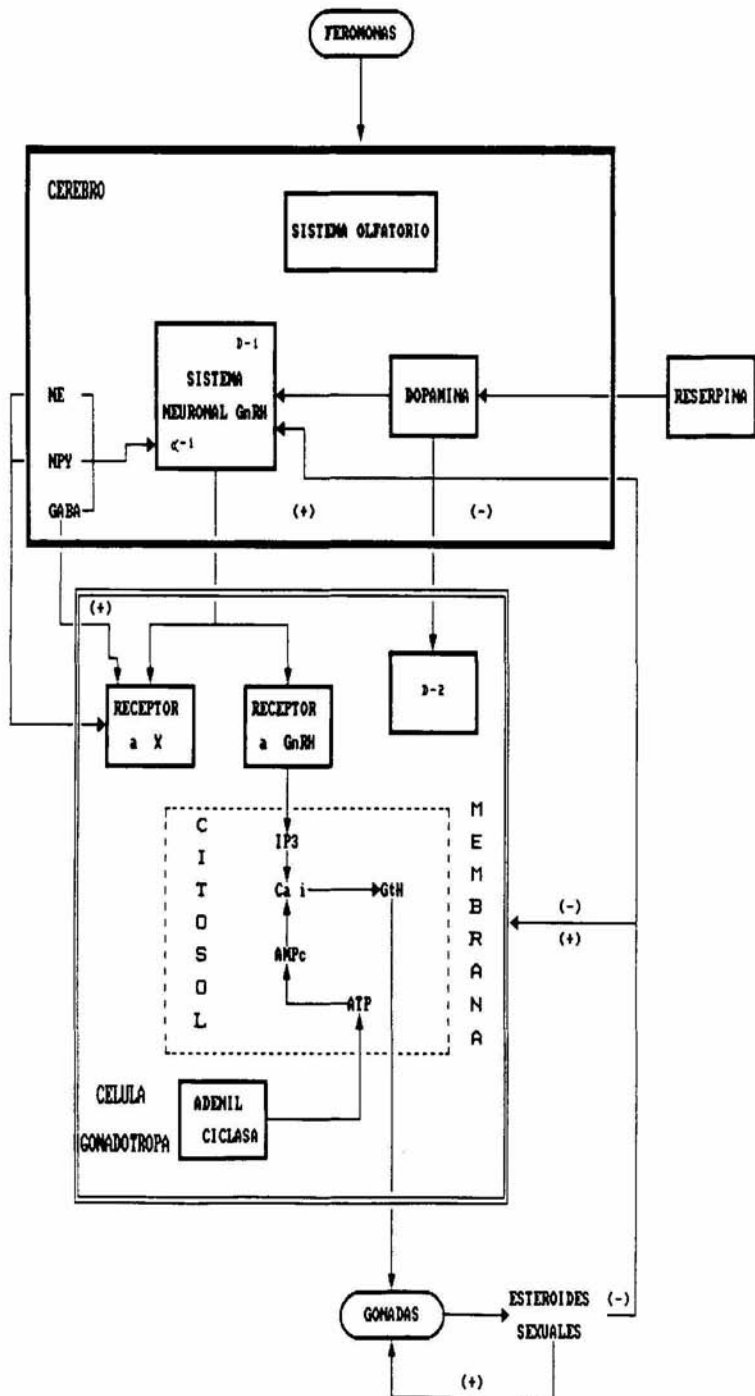


Fig. 1.- Modelo esquemático que muestra los principales estimulantes e inhibidores de la liberación de hormonas gonadotrópicas (Modificado de Peter, 1991 y Cárdenas, datos no publicados); (+) efecto estimulatorio; (-) efecto inhibitorio; GnRH, hormona liberadora de las gonadotropinas; IP3, inositol trifosfato; Ca<sub>i</sub>, calcio intracelular; ATP, adenosín trifosfato; AMPc, adenosín monofosfato cíclico; GtH, hormonas gonadotrópicas; NPY, neuropéptido Y; GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico; NE, norepinefrina;  $\alpha$ -1, receptores  $\alpha$ -1; D-1, receptores D-1; D-2, receptores D-2; receptor a X, Receptor a otras sustancias.

### **OBJETIVO**

Evaluar a través de un parámetro histológico el efecto de la reserpina sobre la espermatogénesis de ejemplares juveniles de carpa común (Cyprinus carpio).

## M E T O D O L O G I A

Un total de 34 machos juveniles (aprox. 100 gr. de peso) sexados por presión abdominal con la consecuente obtención de semen, fueron divididos en cuatro grupos, tres de diez y uno de cuatro organismos. Los peces fueron mantenidos en piletas con agua sin cloro y aereación continua, a una temperatura de  $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , con un fotoperiodo de primavera (12 hrs. luz) y se les administró alimento comercial balanceado de pollos marca Purina *ad libitum*.

La reserpina fue preparada a una concentración de  $1\text{mg/lt.}$ , disuelto en propilenglicol-dimetil sulfóxido (9:1) (Ahikami, 1991) inyectada intraperitonealmente (IP), con ayuda de jeringas insulínicas, con aguja número 26.

Los organismos fueron sacrificados por decapitación 48 horas después de la última inyección.

Los grupos fueron llamados según su tratamiento:

a) Experimental: A los peces pertenecientes a este grupo se les aplicaron 8 inyecciones de reserpina ( $1\text{ mg/Kg}$  de peso), una cada 48 horas según la dosis empleada por Sokolowska. (1989).

b) Testigo: A estos organismos se les aplicaron 8 inyecciones de vehículo en las mismas proporciones, tiempos y condiciones que para el grupo experimental.

c)Control: No recibió ningún tratamiento, sacrificándose los organismos al mismo tiempo que los organismos del grupo testigo y experimental.

d)Control inicial: Cuatro organismos fueron sacrificados justo al inicio del experimento, a fin de contar con un registro de la condición que guardaba la gónada en ese momento.

Los organismos lo mismo que sus gónadas, fueron medidos y pesados para obtener su índice gonado-somático (IGS). Posteriormente las gónadas fueron fijadas en formol neutro y divididas en tres regiones, anterior, media y posterior, para su procesamiento por medio de la técnica histológica de rutina. De cada segmento de la gónada se realizaron 5 cortes no seriados (se dejaban pasar 20 cortes) de 3 micras de grosor con ayuda de un microtomo rotatorio tipo Minnot American Optical para ser analizados al microscopio, (Fotomicroscopio Nikon Tipo 106) donde se realizaron conteos de grupos celulares para determinar el número de cistos de espermatocitos primarios (E1) y secundarios (E2) tanto por corte como por unidad de área (1mm<sup>2</sup>).

A las mediciones obtenidas de dichos parámetros se les aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis.

METODOLOGIA  
CARPA COMUN  
*Cyprinus carpio*

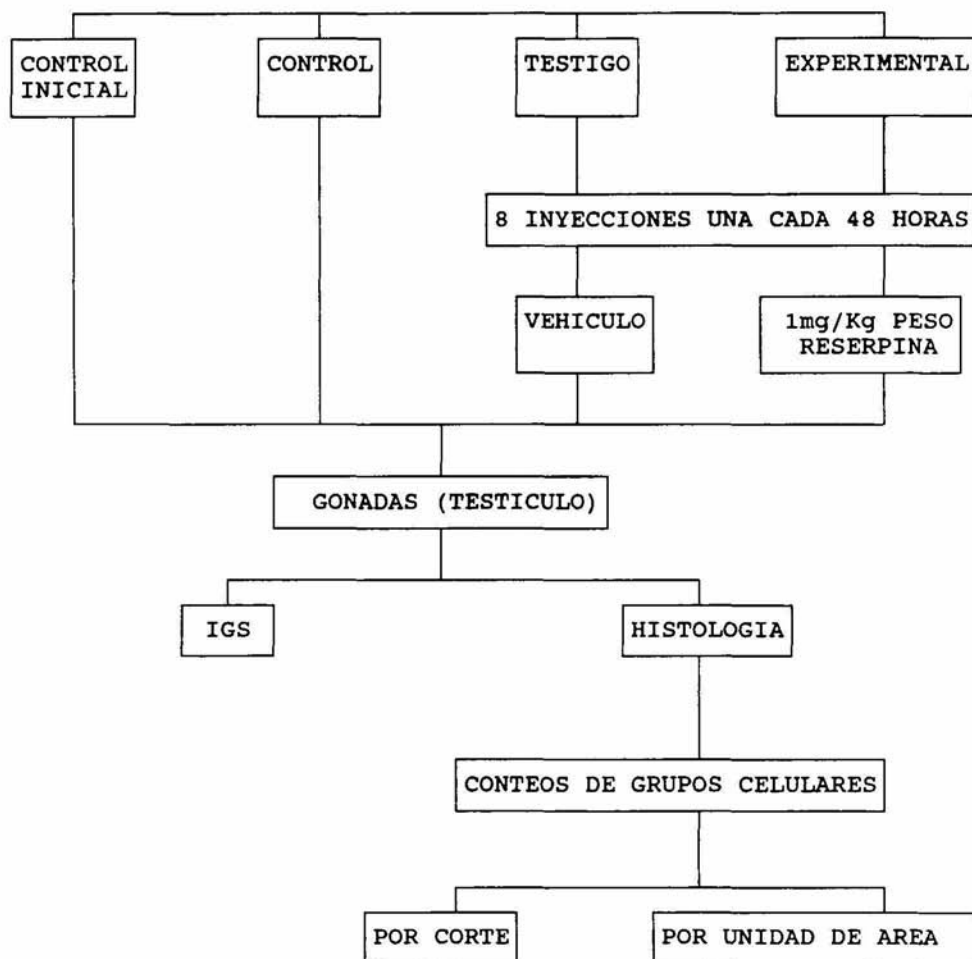


Fig. 2 Diagrama de flujo que muestra las actividades realizadas durante el trabajo experimental.

## R E S U L T A D O S

En los I.G.S. calculados para los diferentes grupos de trabajo (tabla 1) se observa un ligero incremento en el grupo experimental con respecto a los otros grupos, sin embargo estadísticamente estos resultados no fueron significativamente diferentes (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ). Al presentar estos datos en términos de porcentajes (gráfica 1) considerando la media del grupo control como 100%, se puede observar un incremento, del 6% en el grupo testigo y de 20% en el experimental.

Los peces trabajados tuvieron gónadas relativamente maduras, ya que a la presión presentaron esperma, aunque en pequeñas cantidades, por lo que fué posible observar en los cortes todos los grupos celulares de la espermatogénesis. (Fotos 1, y 2).

Al revisar los cortes histológicos realizados, se observó que los grupos celulares (cistos) en los que se podían marcar diferencias más visibles fueron los de espermatocitos (Fotos 2 y 4). El conteo de los mismos se consideró un parámetro adecuado para determinar el efecto de la reserpina en la espermatogénesis.

Para obtener datos confiables, se contaron grupos celulares de todo el corte, dado que todas sus células se originan de la división de una de ellas, todas están en la misma etapa de espermatogénesis (Espinosa, 1987).

Para poder contrarrestar el hecho de que el diámetro testicular fué diferente para cada organismo, se hizo una conversión para obtener conteos por unidad de área (1 mm<sup>2</sup>).

Esto se realizó calculando el área de cada corte que fué contado, después se dividió el valor obtenido de conteo total de dicho corte entre su área previamente calculada.

En el grupo control inicial se realizaron los conteos de las tres regiones en que se dividieron los testículos (anterior, media y posterior), (Apéndice 1) se analizaron estadísticamente y sólo en un organismo se encontró diferencia significativa en la región posterior con respecto a las otras dos, esto se debió al tamaño de dicha región, que fué de menor diámetro, ocasionado por ser la última zona de la gónada que madura, (Toledo, 1991) por lo que se tomó la decisión de contar en los demás grupos los cortes que fueran de las regiones anterior o media indistintamente.

Con lo que respecta a los tipos celulares que se encuentran en los testículos, las espermatogonias, que no forman cistos, no fueron contadas, pero sí fué notada su presencia en forma más frecuente que en los grupos controles y en el testigo, estando localizadas principalmente a la periferia de los cortes. (Foto 1)

Los grupos celulares más observados fueron los de E1, (Fotos 2, 3 y 4) ya que se observaron en todos los cortes revisados en los cuatro grupos (Tabla 2). El grupo con mayor cantidad de E1s fué el experimental, en el conteo por corte presentando un valor promedio más alto al de los otros grupos, lo que se manifiesta de manera más notable al observar los mismos resultados por unidad de área, pero esto no representó un incremento estadísticamente significativo (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).



De los valores de las medias de dichos conteos se obtuvo el porcentaje de variación entre los grupos, tomando como base (100%) al grupo control donde se observó un incremento en los grupos testigo y experimental de 21 y 62% por corte y 63 y 71% por unidad de área respectivamente. (Gráfica 2).

En lo que respecta a los E2, no fueron tan fácil de observar como los E1, (Fotos 1 y 4) ya que la media más alta en los conteos de cistos (grupo experimental) equivale a poco más del 10% de la media más alta de E1 (mismo grupo) tanto por corte como por unidad de área (Tabla 2). En este caso si existió diferencia estadísticamente significativa (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). El incremento en el porcentaje por corte y por unidad de área (Gráfica 3) es considerablemente mayor en el grupo experimental, que corresponde a 1280%, seguido del grupo testigo (335%) en el conteo por corte con respecto al grupo control. Cabe señalar, que en este caso sólo se consideraron los grupos Experimental, Testigo y Control, ya que en el Grupo Control Inicial sólo se observaron cistos secundarios en un organismo.

En los conteos realizados hubo una variabilidad muy grande, que se reflejó en los valores de varianza, que fueron muy disparados en los diversos grupos, por lo que no se pudo aplicar alguna prueba paramétrica como la ANOVA, por lo que se recurrió a la prueba no paramétrica de Análisis de Medianas de Kruskal Wallis, apoyada con la comparación de porcentaje de medias. (Sokolowska, 1988; Chang, 1983, Peter, 1991; etc.).



FOTOGRAFIA 1: Acercamiento de un corte de testículo de un ejemplar del Grupo Control donde se pueden observar algunas espermatogonias (ES), cél. intersticiales o de Leydig (CI), espermatoцитos secundarios (E2). (200X, H y E).



FOTOGRAFIA 2: Acercamiento de un corte de testículo de un ejemplar del Grupo Testigo donde se muestran cistos de E1. (200X, H y E).



FOTOGRAFIA 3: Panorama de un corte de testículo de un ejemplar del Grupo Experimental donde se observan grupos de espermatocitos, representados por las zonas oscuras. (40X, H y E).



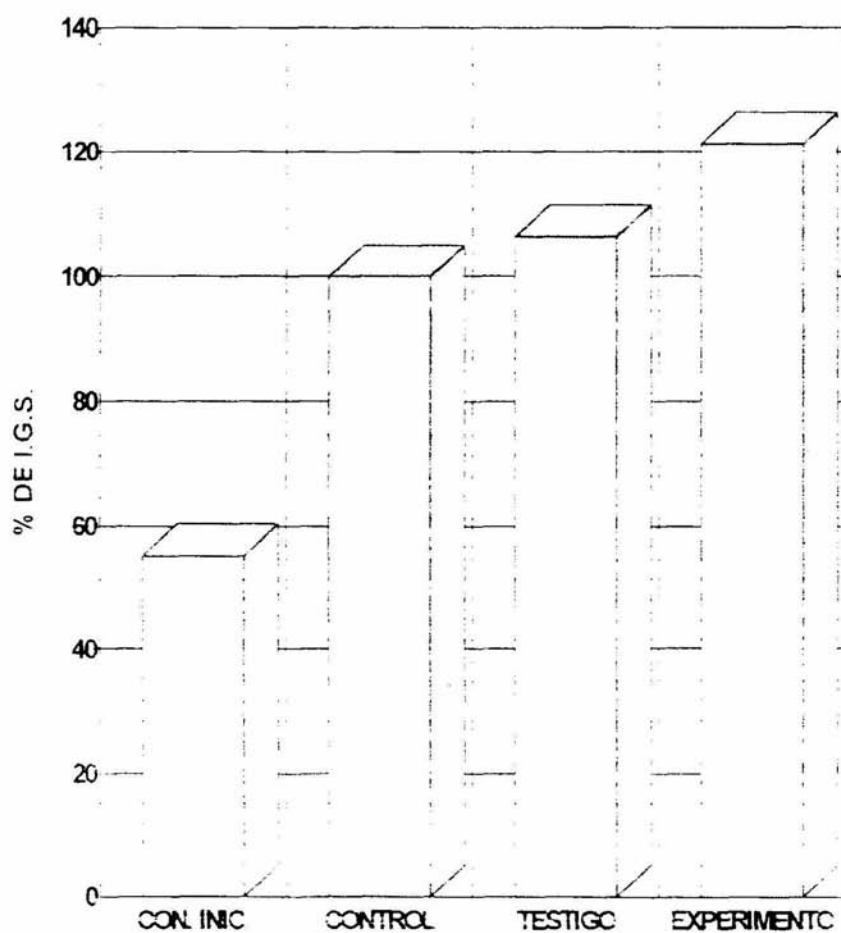
FOTOGRAFIA 4: Acercamiento de un corte de testículo de un ejemplar del Grupo Experimental donde se observan grupos de E1 y E2. (200X, H y E).

## I G S

GRUPO	$x \pm \sigma (n)$
CONTROL INICIAL	$1.670 \pm 0.63 (4)$
CONTROL	$3.016 \pm 1.82 (10)$
TESTIGO	$3.028 \pm 2.51 (10)$
EXPERIMENTAL	$3.657 \pm 1.95 (10)$

Tabla 1. Medidas de los valores de IGS obtenidos en cada grupo de trabajo. ( $\sigma$ =desviación estándar;  $n$ =número de datos).

# I.G.S. PORCENTAJE



GRAFICA 1. PORCENTAJE DEL IGS  
TOMANDO COMO REFERENCIA LA MEDIA  
DEL GRUPO DE CONTROL (100%)

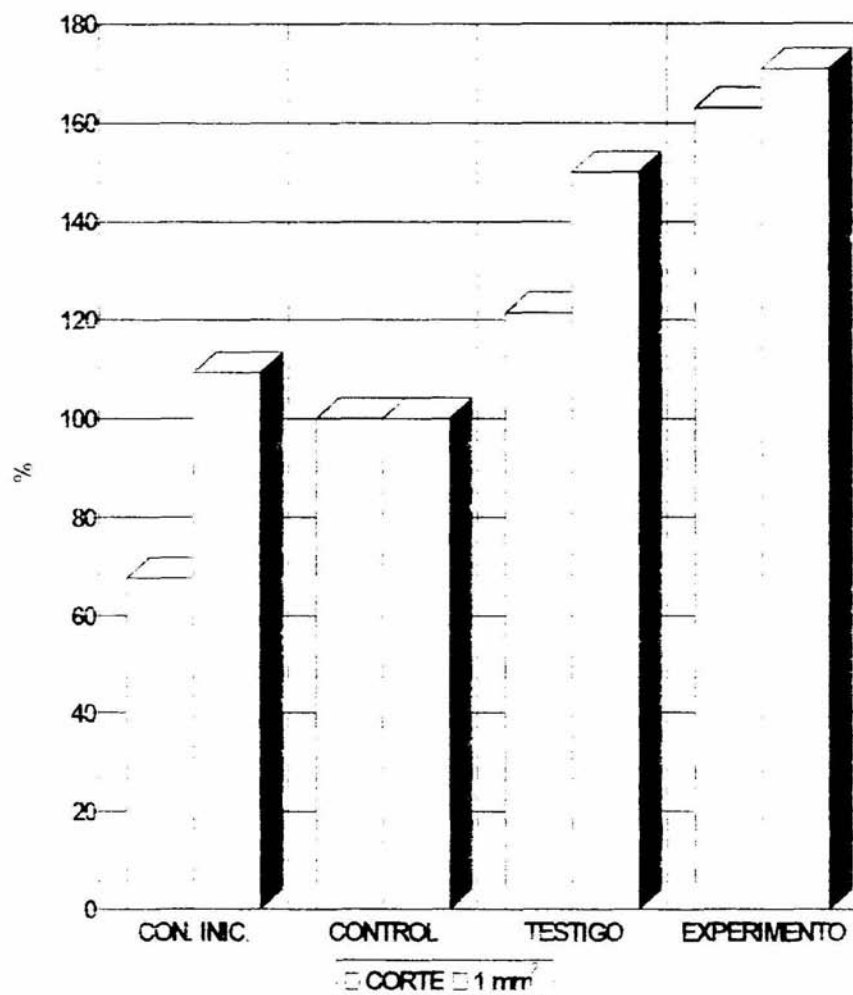
E S P E R M A T O C I T O S

GRUPO	E1		E2	
	CORTE	1mm2	CORTE	1mm2
CONTROL INICIAL	735 ± 188.16	20.69 ± 11.774 (4)	4.25 ± 8.5 (4)	0
CONTROL	1085 ± 488.41	18.94 ± 12.17 (10)	13.90 ± 11.61 (10)	0.38 ± 0.397 (10)
TESTIGO	1318 ± 859.58	28.29 ± 23.63 (10)	39.0 ± 60.95 (10)	1.504 ± 1.555 (10)
EXPERIMENTAL	1767.2 ± 1170.74	32.34 ± 24.757 (10)	192.3 ± 242 (10)	4.477 ± 7.9247 (10)

Tabla 2. Media de los valores obtenidos para cistos de E1 y E2 señalando la desviación estándar y el número de organismos trabajados por grupo.

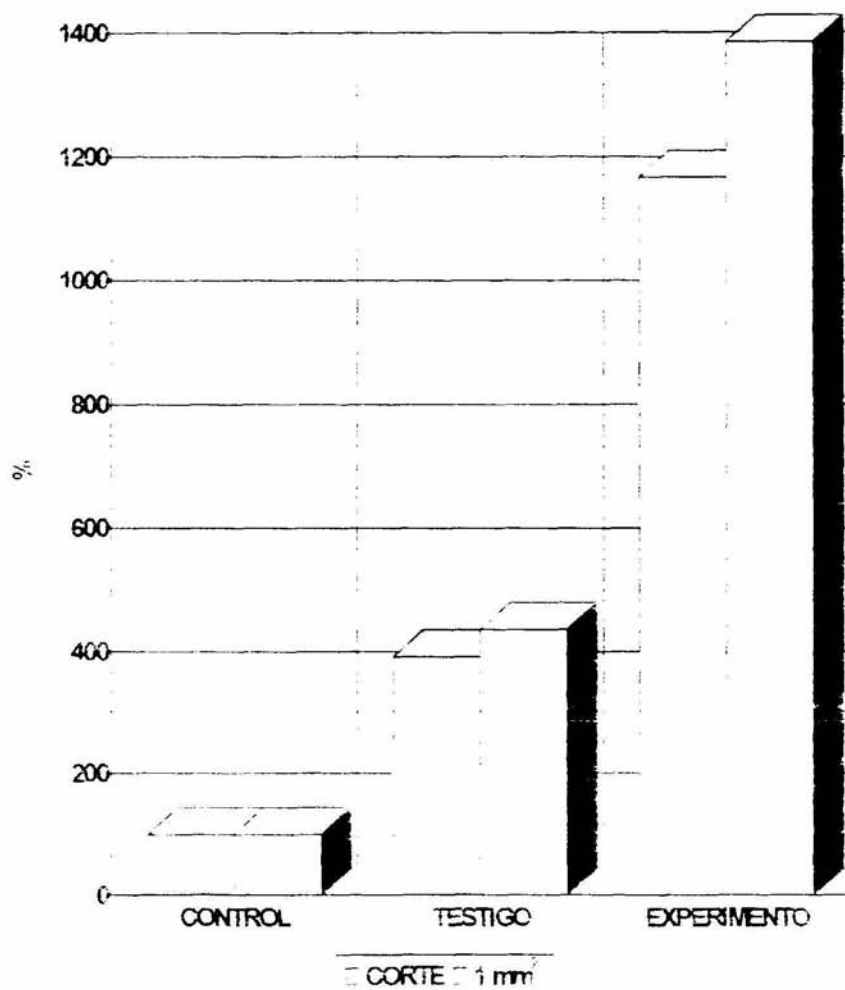


# PRIMARIOS PORCENTAJE



GRAFICA 2. PORCENTAJE DE E1  
TOMANDO COMO REFERENCIA LA  
MEDIA DEL GRUPO DE CONTROL (100%)

# SECUNDARIOS PORCENTAJE



GRAFICA 3. PORCENTAJE DE E2  
TOMANDO COMO REFERENCIA LA  
MEDIA DEL GRUPO DE CONTROL (100%)

## D I S C U S I O N

En el testículo de los peces se encuentran diferentes grupos celulares tales como espermatogonias, E1, E2, espermátides y espermatozoides. Es evidente que en aquellos animales que van madurando la presencia de diferentes estadios celulares más avanzados van a ser más frecuentes y a través de ello se puede conocer, como en este trabajo, si la reserpina ayuda a promover el proceso de espermatogénesis evaluando, de manera morfológica, las variaciones en el número de los diferentes grupos celulares presentes en los cortes histológicos de testículo.

Del análisis de los IGS obtenidos en los cuatro grupos (Tabla 1), se obtuvo un ligero incremento no significativo en el grupo experimental; (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ) lo cual puede interpretarse como un pequeño aumento en la masa testicular de dicho grupo, que puede reflejar mayor actividad gonádica, aunque cabe mencionar que al pesar las gónadas de un organismo no se están considerando sólo las células germinales, sino que también se toma en cuenta todo el tejido intersticial, que evidentemente conforma una mayor proporción del peso total de la gónada cuando está menos madura, (Espinosa, 1987), por lo que es un parámetro con el que debe tenerse precaución al momento de hacer correlaciones.

La observación de espermatogonias más clara en los grupos control y testigo pudo deberse a que en el grupo experimental no fueron tan evidentes debido a que estas células se aprecian menos cuando se incrementa el grado de madurez del pez, ya que se

dividen para formar cistos de espermatocitos primarios y el incremento de otros tipos celulares hace que se observen menos y más dispersas. (Ramírez, 1993).

El haber contado espermatocitos, en particular los E2, es un parámetro confiable para valorar el efecto de la reserpina en la espermatogénesis dado que van a dar origen a espermátides y espermatozoides. En las dos etapas celulares anteriores (espermatogonias y E1), la espermatogénesis puede quedar detenida en la época de recrudescencia gonádica, por lo que dichos estadios pueden durar relativamente mucho tiempo, pero no ocurre esto cuando hay E2, ya que al realizarse en ellos la meiosis II, sólo se dividen para formar espermátides, por lo que no se detiene ya el proceso en ellos (Leeson 1989).

El incremento en E1s y E2s muestra que hubo un efecto en la espermatogénesis que se puede traducir como una activación de más células, ya que el tener organismos con semen indica que ya se inició el proceso fisiológico y al aplicar reserpina ocurre en mayor escala, como consecuencia seguramente de la liberación de GtH en la hipófisis que ya ha sido reportado (Sokolowska, 1988; Chang, 1983).

El hecho de haber encontrado mayor cantidad de cistos de espermatocitos, sobre todo de E2s en el grupo experimental donde existió diferencia estadísticamente significativa, en comparación con los demás grupos, permite corroborar de manera indirecta que la reserpina, de acuerdo con Sokolowska (1988) y Chang, (1983), al depletar la dopamina, permite que haya mayor liberación de

gonadotropinas (GtH) y, por consiguiente, se ve favorecida la espermatogénesis.

Es conocido que la reserpina agota al mínimo la concentración de catecolaminas en 24 horas, y éstas son restauradas lentamente. Al aplicar dosis repetidas de reserpina hay una acción acumulativa (Drill, 1978; Chang, 1983) y por consiguiente, al haber administrado en este trabajo este fármaco, se puede deducir que se favoreció la depleción de dopamina, y como consecuencia, el incremento en la liberación de GtH.

Otro de los efectos de la reserpina es la disminución de la síntesis de norepinefrina debido a que bloquea la captación de dopamina, precursor de la norepinefrina, por los gránulos de almacenamiento que contienen la enzima beta-hidroxilasa (Drill, 1978) y como consecuencia de esto, la disminución en los niveles de GnRH en el telencéfalo e hipotálamo (Peter, 1990), lo que ayuda a comprender el por qué al inyectar reserpina con análogos de GnRH sean mucho mayores los niveles de GtH en suero, como lo demostró Sokolowska (1988).

Peter (1990) demostró que al inhibir la síntesis de catecolaminas existió un incremento significativo de GnRH sólo en el bulbo olfatorio, lo que muestra que el que no se sintetice norepinefrina por efecto de la reserpina, no ocasiona una disminución total de GnRH. Además, al provocar la dopamina un decremento en la capacidad y afinidad de los receptores de GnRH, pequeñas cantidades de esta hormona tienen un mayor efecto sobre las células gonadótropas en la síntesis y liberación de GtH en

ausencia de dopamina, como lo demostraron Peter, (1991) y Omeljaniuk. (1989a).

En organismos juveniles se ha observado que existe una retroalimentación positiva entre GtH y esteroides sexuales, al parecer para favorecer la madurez gonádica, (Crim, 1983; Peter, 1991) por lo que dosis sostenidas de reserpina pueden ocasionar un incremento sostenido en los niveles de GtH en plasma, (Sokolowska, 1988) la consiguiente depleción de dopamina cerebral y un incremento en los esteroides sexuales, lo cual trae como consecuencia un incremento en la espermatogénesis como lo demostró Chang. (1983).

Si bien es posible observar un incremento en E2 en el grupo testigo, pudiera deberse al proceso de manipulación durante el experimento, pues en ninguno de los casos se utilizó anestésico durante la aplicación de las inyecciones, y es sabido que bajo condiciones de estrés la liberación de adrenalina y noradrenalina se incrementa. Esta última, de estar presente en la hipófisis cerca de las células gonadótropas es capaz de inducir la liberación de GtH, pudiendo con ello favorecer un pequeño incremento en la espermatogénesis. (Peter, 1990). Sin embargo, en el grupo experimental que fué manipulado bajo las mismas condiciones y aunque el estrés también pudo influir, hubo un aumento considerablemente mayor de E2, por lo que la reserpina tuvo que estimular la espermatogénesis.

Los sistemas hipofisiario y gonádico son dependientes de AMPc y ((Ca)i) (Chang, 1993), por lo que sería

interesante aplicar análogos por medio de liposomas a organismos de esta especie, a fin de saber si estos análogos son capaces de estimular la espermatogénesis *in vivo*.

Sería recomendable repetir el mismo experimento, pero registrando variaciones de GtH y testosterona en sangre, con el objeto de conocer si estas hormonas se comportan de manera similar a la reportada en condiciones normales cuando existe un incremento en la gametogénesis. También se puede realizar un estudio del comportamiento de las células de Leydig, para establecer si realmente existe un incremento en su actividad celular y, por consiguiente, mayor síntesis y secreción de testosterona.

Como demostró Sokolowska (1988), la reserpina favorece la espermatogénesis con una dosis de 1 mg/Kg peso en carpas maduras ya que registró un incremento en los niveles de GtH sérica y en los volúmenes de esperma hasta 48 horas después de la inyección. En este trabajo los datos obtenidos son similares para carpas juveniles ya que al parecer también incrementa la espermatogénesis pues se observó un aumento en el peso gonadal y en el número de cistos secundarios encontrados en peces juveniles inyectados 8 veces con dosis similar, una cada 48 horas.

### C O N C L U S I O N E S

1)Al inyectar intraperitonealmente ocho veces 1 mg/Kg de peso Reserpina existe un ligero incremento no significativo en el IGS en machos juveniles de carpa común Cyprinus carpio.

2)La reserpina no promovió un incremento significativo en el número de cistos de El en el testículo de carpa común Cyprinus carpio.

3)La reserpina produce un incremento significativo en el número de cistos de espermatocitos secundarios en el testículo de Cyprinus carpio.



## A P E N D I C E 1

Se muestran los conteos realizados de E1 en los organismos control inicial en las regiones anterior media y posterior.

ORGANISMOS	ANTERIOR	MEDIA	POSTERIOR
1	925	474	637
2	759	765	753
3	731	923	283
4	859	778	817

En el único caso que hubo diferencia significativa (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ) fue en el ejemplar número tres, en la región posterior con respecto a la anterior y media.

## B I B L I O G R A F I A

Ahikam G., Levavi-Sivan B., Rubin-Kedem H. Ofir M., Yaron Z. (1991) The effect of gonadotropin releasing hormone superactive analog and dopamine antagonists on gonadotropin level and ovulation in tilapia hybrids. **ISR Journal of Aquaculture Bamidgeh** 43(4): 123-136.

Austin C.R., Short R.V. (1982) *Hormonas en la Reproducción*. Ed. Prensa Médica Mexicana, S.A. México.

Ball, J.N. and Baker, B.I. (1972) Investigations on Hypothalamic Control of Adenohypophysial Functions in Teleost Fishes. **Gen. Comp. Endocrinol. Supplement. 3: 11-21**

Billard, R.; Breton, R. Dubois, M. P. (1971) Immunocytologie et Histochemie des Cellules Gonadotropes et Thyroïdotes Hypophysaires chez la Carpe Cyprinus carpio c.r. hrbd Seances. **Acad. Sci., Ser. D. 272: 981-983.**

Billard, R.; Alargarswami, K.; Peter, R.E.; Breton, R. (1983) Potentialisation par le pimozide des effets du LHRH-A sur la sécrétion gonadotrope hypophysaire, I' ovulation et la spermiation chez la Carpe commune (Cyprinus carpio) C.R. **Acad. Sci. Paris, Sér. C, 296: 181-184.**

Cook, H.; Berkenbosh, J.W.; Fernhout, M.J.; Yu, K.L.; Peter, R.E.; Chang, J.P.; Rivier, J.E. (1991). Demonstration of Gonadotropin Releasing-Hormone Receptors on Gonadotrophs and Somatotrophs of the Goldfish: an Electron Microscope Study. **Regulatory Peptides. 36: 369-378.**

Crim, L.W.; Peter, R.E.; Billard R. (1981) Onset of Gonadotropin Hormone Accumulation in the Immature Trout Pituitary Gland in Response to Estrogen or Aromatizable Androgen Steroid Hormones. **Gen. Comp. Endocrinol. 44: 374-381.**

Crim, L.W.; Evans, D.M. (1983) Influence of Testosterone and/or Luteinizing Hormone-Releasing hormone Analogue on Precocious sexual Development in the Juvenil Rainbow Trout. **Biol. Reprod. 29: 137-142.**

Chang J.P.; Cook, A.F.; Peter, R.E. (1983) Influence of Catecholamines on Gonadotropin Secretion in Goldfish, Carassius auratus. **Gen. Comp. Endocrinol. 49: 22-31.**

Chang J.P. y Peter, R.E. (1983) Effects of Dopamine on Gonadotropin Release in Female Goldfish Carassius auratus. **Neuroendocrinol. 36: 351-357.**

Chang, J.P.; Mackenzie, D.S.; Gould, D.R.; Peter, R.E. (1984). Effects of Dopamine and Norepinephrine on "in vitro" Spontaneous and Gonadotropin-Releasing Hormone-Induced Gonadotropin Release

by Dispersed Cells or Fragments of the Goldfish Pituitary. *Life Sci* 35: 2027-2033.

Chang, J.P.; Marchant, T.A.; Cook, A.F.; Nahorniak, C.S.; Peter, R.E. (1985) Influences of Catecholamines on Growth Hormone Release in Female Goldfish, Carassius auratus. *Neuroendocrinol.* 40: 463-470.

Chang, J.P.; Freedman, G.L.; De Leeuw, R. (1990). Use of the Pituitary cell Dispersion Method and Primary Culture System for the Studies of Gonadotropin-Releasing Hormone Action in the Goldfish, Carassius auratus. *Gen Comp. Endocrinol.* 77: 274-282.

Chang, J.P.; Yu, K.L.; Wong, A.O.L.; Peter, R.E. (1990c) Differential actions of Dopamine Receptor Subtypes on Gonadotropin and Growth Hormone Release "in vitro" in Goldfish. *Neuroendocrinol.* 51: 664-674.

Chang, J.P.; Wong, A.O.L.; Kraak, V.D.; Goor, F.V.; (1992) Relationship Between Cyclic AMP-stimulated and Native Gonadotropin-Releasing Hormone-Stimulated Gonadotropin Release in the Goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86: 359-377.

Chang, J.P.; Jobin, R.M. and Wong, A.O.L. (1993) Intracellular Mechanisms Mediating Gonadotropin and Growth Hormone Release in the Goldfish, Carassius auratus. *Fish. Physiol. Biochem* 11 (1,6): 25-33.

De Leeuw, R.; Kamphuis, W.; Goos, H.; Van Oordt, P. (1984) Peptidergic and Aminergic Regulation of Gonadotropin Secretion by the Pituitary of the African Catfish Clarias lazera an "in vitro" Study. *Gen. Comp. Endocrinol.* 35: 438-440.

De Leeuw, R.; Habibi, H.R.; Nahorniak, C.S. and Peter, R. E. (1989). Dopaminergic Regulation of Pituitary Gonadotrophin-Releasing Hormone Receptor Activity in the Goldfish (Carassius auratus) *J. Endocrinol.* 121: 239-247.

Dobourg, P.; Burzawa-Gerard, E.; Chambolle, P.; Kah, O. (1985) Light and Electron Microscopic Identification of Gonadotropic Cells in the Pituitary Gland of the Goldfish by Means of Immunocytochemistry. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59: 472-481.

Drill V.A., (1978) *Farmacología Médica*, 2ª ed. Ed. Prensa Médica Mexicana, S.A. México.

Duff S.B., Kah O., Trudeau V.L., Dulka J.G., Peter R.E. (1992) Amino acid neurotransmitters and dopamine in brain and pituitary of the goldfish: Involvement in the regulation of gonadotropin secretion. *Journal of Neurochemistry* 58(6) 2254-2262

Dulka, J.G.; Sloley, B.D.; Stacey, N.E.; Peter, R.E. (1992) A Reduction in Pituitary Dopamine Turnover is Associated with Sex Pheromone-Induced Gonadotropin Secretion in Male goldfish. *Gen.*

**Comp. Endocrinol. 86: 496-505.**

Espinosa, M.J.; Labarta, U. (1987) Reproducción en Acuicultura. Industrias Gráficas de España. 1-131.

Ge, W.; Peter, R.E.; Vaughan, J.; Rivier, J.; Vale, W. (1991) Inhibin/Activin-Like Protein-Mediated Feedback Between the Pituitary and Ovary in Goldfish. Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norwich, U.K.

Ge, W.; Chang, J.P.; Peter, R.E.; Vaughan, J.; Rivier, J.; Vale, W. (1992) Effects of Porcine Follicular Fluid, Inhibin-A and Activin-A on Goldfish Gonadotropin Release "in vitro". **Endocrinol. 131(4): 1922-1929.**

Ge, W.; Cook, H.; Peter, R.E.; Vaughan, J.; Vale, W. (1993) Immunocytochemical Evidence for the Presence of Inhibin and Activin-like Proteins and their Localization in Goldfish gonads. **Gen. Comp. Endocrinol. 89: 333-340.**

Ge, W.; Gallin, W.J.; Strobeck, C.; Peter, R.E. (1993) Cloning and Sequencing of Goldfish activin Subunit Genes: Strong Structural Conservation During Vertebrate Evolution. **Biochemical and Biophysical Research Communications. 193(2): 711-717**

Goodman G.A., Goodman L.S., Rall, T.W., Murad F. (1986) Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 7ª ed. Ed. Médica Panamericana, México.

Habibi, H.R.; Marchant, C.S.; Nahorniak, H.; Van Der Loo; Peter R.E. Rivier, J.E.; Vale W.W. (1989) Functional Relationship Between Receptor Binding and Biological Activity For Analogs of Mammalian and Salmon Gonadotropin-Releasing Hormone in the Pituitary of Goldfish (Carassius auratus). **Biol. Reprod. 40: 1152-1161.**

Habibi, H.R.; Peter, R.E.; Hazum, E. (1990) Photoaffinity Labeling of pituitary Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors in Goldfish (Carassius auratus). **Biol. Reprod. 43: 1006-1011.**

Habibi, H.R. (1991) Homologous Desensitization of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptors in the Goldfish Pituitary: Effects of Native GnRH Peptides and Synthetic GnRH Antagonist. **Biol. Reprod. 44: 275-283.**

Habibi, H.R.; Peter, R.E.; Nahorniak, C.S.; Milton, R.C.; Millar, R.P. (1992) Activity of Vertebrate Gonadotropin Releasing Hormones and Analogs with Variant Amino Acid Residues in Positions 5, 7 and 8 in the Goldfish Pituitary. **Regulatory Peptides 37: 271-284.**

Ham A.W., Cormack D.H. (1985) Tratado de Histología. 8ª ed. Ed. Interamericana, S.A. de C.V. México.

Huang, Y.P.; Peng, C.; Peter, R.E. (1991) Metabolism of Gonadotropin-Releasing Hormone in Goldfish: Serum Clearance and Tissue uptake Studies. **Gen. Comp. Endocrinol.** **84**: 67-75.

Huang, Y.P.; Trudeau, V.L. Peter, R.E. (1991) Evaluatory of a Specific Gonadotropin-Releasing Hormone Binding Protein in the Serum of Goldfish: a Study on the Influence of sex, Season, GnRH Injection and Estradiol Treatment "in vitro". **Gen. Comp. Endocrinol.** **84**: 76-82.

Huang, Y.P.; Gou, D.C.; Peter, R.E. (1991) Isolation and Characterization of a Gonadotropin Releasing Hormone Binding Protein in Goldfish Serum. **Gen. Comp. Endocrinol.** **84**: 58-66.

Hyder, M. (1972) Endocrine Regulation of Reproduction in Tilapia. **Gen. Comp. Endocrinol. Supplement 3**: 729-740.

Idler, D.R., Ng. T.B.; (1979). Studies on two Types of Gonadotropins from both Salmon and Carp Pituitaries. **Gen. Comp. Endocrinol.** **38**: 421-440.

Idler, D.R.; Ng. T.B. (1983). Teleost Gonadotropins: Isolation, Biochemistry, and Function. **Fish Physiol.** Vol. IXA pp.187-221.

Itoh, H.; Suzuki, K.; Kawachi, H. (1990). The Complete amino acid Sequences of alpha Subunits of chum Salmon Gonadotropins. **Gen Comp. Endocrinol.** **78**: 56-65.

Jobin, R.M.; Chang, J.P. (1993) Involvement of Protein Kinase C. in the Modulation of Gonadotropin and Growth Hormone Secretion from Dispersed Goldfish Pituitary Cells. **Fish Physiol. Biochem.** **11 (1,6)**: 35-42.

Kah, O. (1986). Central Regulation of Reproduction in Teleosts. **Fish. Physiol. Biochem.** **2 (1,4)**: 25-34.

Kah, o.; Trudeau, V.L.; Soley, B.D.; Chang, J.P.; Dobourg, P.; Yu, K.L.; Peter. R.E. (1992) Influence of GABA on Gonadotropin Release in the Goldfish. **Neuroendocrinol.** **55**: 396-404.

Kawachi, H.; Suzuki, K.; Itoh, H.; Swanson, P.; Naito, N.; Yoshitaka, N.; Nozaki, M.; Nakai, Y.; Itoh, S. (1989). The Duality of Teleost Gonadotropins. **Fish Physiol. Biochem.** **7 (1,4)**: 29-38.

Kraak, G.V.D.; Rosenblum, P.M.; Peter, R.E. (1990) Growth Hormone-Dependent Potentiation of Gonadotropin-Stimulated Steroid Production by Ovarian Follicles of the Goldfish. **Gen. Comp. Endocrinol.** **79**: 233-239.

Leeson T.S., Leeson C.R., Paparo A.A. (1989) *Texto/Atlas de Histología*. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. México.

Lin, X.W.; Lin, H.R. Peter, R.E. (1993) Growth Hormone and Gonadotropin Secretion in the carp comun (*Cyprinus carpio* L.):

"in vitro" Interactions of Gonadotropin-Releasing Hormone, Somatostatin, and Dopamine Agonist Apomorphine. **Gen. Comp. Endocrinol.** **89**: 62-71.

Lovejoy, D.A.; Fisher, W.H.; Ngamvongchon, S.; Craig, A.G.; Nahorniak, C.S.; Peter, R.E.; Rivier, J.E.; Sherwood, N.M. (1992) Distinct Sequence of Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) in dogfish Brain Provides Insight into GnRH Evolution. **Neurobiol.** **89**: 6373-6377.

Marchant, T.; Chang, J.P.; Nahorniak, C.S.; Peter, R.E. (1989). Evidence that Gonadotropin Releasing Hormone also Functions as a Growth Hormone Releasing Factor in the Goldfish. **Endocrinol** **124** (5): 2509-2518.

Murthy C.K.; Peter, R.E.; Rivier J.E. Vale, W. (1991) Characterization of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Antagonist in goldfish. (Carassius auratus). Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norwich, U.K.

Ng, T.B.; Idler, D.R. (1979). Studies on Two types of gonadotropins from both american plaice and winter flounder pituitaries. **Gen Comp. Endocrinol.** **38**: 410-420.

Ngamvongchon, S.; Lovejoy, D.A.; Fischer, W.H.; Craig, A.G.; Nahorniak, C.S.; Peter, R.E.; Rivier, J.E.; Sherwood, N.M. (1992) Primary Structures of Two Forms of Gonadotropin-Releasing Hormone, One Distinct and One Conserved, From Catfish Brain. **Molecular and Cellular Neurosciences** **3**, 17-22.

Nozaki M., Naito N. Swanson P. Miyata K. Nakai Y. Oota Y. Suzuki K. Kawauchi H. (1990) Salmonid Pituitary Gonadotrophs. I. Distinct Cellular Distributions of Two Gonadotropins, GTH I and GTH II. **General Comparative Endocrinology** **77**, 348-357.

Nozaki M., Naito N., Swanson P., Dickhoff W.W., Miyata K., Nakai Y., Suzuki K., Kawauchi H. (1990) Salmonid Pituitary Gonadotrophs. II. Ontogeny of GTH I and GTH II Cells in the Rainbow Trout (Salmo gairdneri irideus). **General Comparative Endocrinology** **77**, 358-367.

Omeljaniuk R.J. Tonon M.C. Peter R.E. (1989) Dopamine Inhibition of Gonadotropin and  $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone Release "in vitro" from the Pituitary of the Goldfish (Carassius auratus) **General and Comparative Endocrinology** **74**, 451-467.

Omeljaniuk, R.J.; Shih, S.H.; Peter, R.E. (1987). "In vivo" Evaluation of Dopamine Receptor-Mediated Inhibition of Gonadotropin Secretion from the Pituitary Gland of the Goldfish, Carassius auratus. **J. Endocrinol.** **114** : 449-458.

Omeljaniuk, R.J.; Habibi, H.R.; Peter, R.E. (1989a). Alterations in Pituitary GnRH and Dopamine Receptors Associated with the Seasonal Variation and Regulation of Gonadotropin Release in

- goldfish (Carassius auratus) **Gen. Comp. Endocrinol.** 74: 392-399.
- Peng, Ch.; Huang, Y.p.; Peter, R.E. (1990) Neuropeptide Y stimulates Growth Hormone and Gonadotropin Release from the Goldfish Pituitary "in vitro". **Neuroendocrinol.** 52: 28-34.
- Peng, Ch.; Chang, J.P.; Yu, K.L.; Wong, A.O.L.; Goor, F.V.; Peter, R.E.; Rivier, J.E. (1993) Neuropeptide-Y stimulates Growth Hormone and Gonadotropin II Secretion in the Goldfish Pituitary: Involvement of Both Presynaptic and Pituitary cell Actions. **Endocrinol.** 134 (4): 1820-1829.
- Peter, R.E. (1981) Gonadotropin Secretion During Reproductive Cycles in Teleosts: Influences of Enviromental Factors. **Gen. Comp. Endocrinol.** 45: 294-305.
- Peter, R.E. (1983) The Brain and Neurohormones in Teleost Reproduction. **Fish Physiol.** Vol: IX, part A. Academic Press. New York. pp 97-135.
- Peter, R.E.; Nahorniak, C.S. (1985) Structure-activity relationships of Mammalian, Chicken and Salmon Gonadotropin Releasing Hormones "in vivo" in Goldfish. **Gen. Comp. Endocrinol.** 58: 231-242.
- Peter, R.E.; Omeljaniuk, R.E.; Habibi, H.R. (1988). Alterations in Pituitary GnRH and Dopamine Receptors Associated with the Seasonal Variation and Regulation of Gonadotropin Release in the Goldfish Carassius auratus. **Gen. Comp. Endocrinol.** 74: 392-399.
- Peter, R.E.; Habibi, H.R.; Chang, J.P.; Nahorniak, C.S.; Yu, K.L.; Huang, Y.P.; Marchant, T.A. (1990) Actions of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in the Goldfish. **Progress in Comp. Endocrinol.**: 393-398.
- Peter, R.E.; Kei-Li, Y.; Marchant, T. (1990). Direct Neural Regulation of the Teleost Adenohypophysis. **J. Experimen. Zool. Supplement.** 4: 84-89.
- Peter, R.E.; Crim, L.W.; Billard, R. (1991). A Sterotaxic Atlas and Implantation Technique for Nuclei of the Diencephalon of Atlantic Salmon (Salmo salar). **Reprod. Nutr. Dev.** 31: 167-186.
- Peter, R.E.; Trudeau, V.L.; Soley, B.D. (1991) Brain Regulation of Reproduction in Teleost. **Bull. Inst. Zool. Academia Sinica, Monograph.** 16: 89-118.
- Peter, R.E. Trudeau, V.L.; Soley, B.D.; Peng, C.; Nahorniak, C.S. (1991) Actions of Catecholamines, Peptides and Sex Steroids in Regulation of Gonadotropin-II in the Goldfish. Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norwich, U.K. pp 30-34.
- Pieter, G.W.J.; Van Oordt. (1987). Modrn tends in Reproductive



Endocrinology of Teleosts. **Pro. V. Congr. Europ. Ichthyol., Stockholm.**: 247-268.

Ramírez, E.C. y Ortiz B. (1993) Obtención de Gonadotropinas de Peces. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztacala.

Rosenblum, P.M.; Peter, R.E. (1989) Evidence for the Involvement of Endogenous Opioids in the Regulation of Goldfish Secretion in Male Goldfish, Carassius auratus. **Gen. Comp. Endocrinol.** 73: 21-27.

Rodríguez, C.R. (1984) Vademécum Académico de Medicamentos Tomo II, Facultad de Medicina, U.N.A.M. México.

Sloley, B.D.; Trudeau, V.L.; Dulka, J.G.; Peter, R.E. (1991) Selective Depletion of Dopamine in the Goldfish Pituitary caused by Domperidone. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 69: 776-781.

Sloley, B.D.; Kah, O.; Trudeau, V.L.; Dulka, J.G.; Peter, R.E. (1992) Amino acid Neurotransmitters and Dopamine in Brain and Pituitary of the goldfish: Involvement in the Regulation of Gonadotropin Secretion. **J. Neurochem.** 58 (6): 2254-2262.

Sloley, B.D.; Trudeau, V.L.; Peter, R.E. (1992) Dopamine Catabolism in Goldfish (Carassius auratus) Brain and Pituitary: Lack of Influence of Catecholestrogens on Dopamine Catabolism and Gonadotropin Secretion. **J. Exp. Zool.** 263: 398-405.

Sokolowska M. Peter R.E. Nahorniak C.S., Chang J.P. (1985b) Seasonal Effects of Pimizide and des-Gly (D-Ala ) LHRH Ethylamide on Gonadotropin Secretion in Goldfish. **General and Comparative Endocrinology.** 57, 472-479.

Sokolowska M. Mokolajczyk T. Epler P. Peter R.E. Piotrowski W. Bieniarz K. (1988) The Effects of Reserpine and LHRH or salmon GnRH Analogues on Gonadotropin release, Ovulation and Spermiation in Common Carp (Cyprinus carpio ). **Reproduction, Nutrition and Development** 28, (4A) 889-897.

Somoza G.M. Peter R.E. (1991) Effects of Serotonin on Gonadotropin and Growth Hormone Release from "in vitro" Perfused Goldfish Pituitary Fragments. **General and Comparative Endocrinology** 82, 103-110.

Thomas P. (1990) Teleost Model for Studying the Effects of Chemicals on Female Reproductive Endocrine Function. **The Journal of Experimental Zoology** (Suppl 4): 126-128.

Toledo, R.H. (1991) Estudio Histológico de la Gónada Masculina de Cyprinus carpio. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Trudeau, V.L.; Sloley, B.D.; Wong, A.O.L.; Peter, R.E. (1991) Mechanisms of Sex Steroid Negative and Positive Feedback Control



of Gonadotropin (GtH) Secretion in Teleosts. Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norwich, U.K.

Trudeau, V.L.; Peter, R.E.; Sioley, B.D. (1991) Testosterone and Estradiol Potentiate the Serum Gonadotropin Response to Gonadotropin-Releasing Hormone in Goldfish. **Biol. Rep.** **44**: 951-960.

Trudeau, V.L.; Lin, H.P.; Peter, R.E. (1991) Testosterone Potentiates the Serum Gonadotropin Response to Gonadotropin-Releasing Hormone in carpa comun (Cyprinus carpio) and Chinese loach (Paramisgurnus dabryanus) **Can. J. Zool.** **69**: 2480-2484.

Trudeau, V.L.; Somoza, G.M.; Nahorniak, C.S.; Peter, R.E. (1992). Interactions of Estradiol with Gonadotropin Releasing Hormone and Thyrotropin Releasing Hormone in the Control of Growth hormone Secretion in the Goldfish. **Neuroendocrinol.** **56**: 483-490.

Trudeau, V.L.; Sioley, B.D.; Peter, R.E. (1993) Testosterone enhances GABA and Taurine but not N-methyl-D, L-aspartate stimulation of Gonadotropin secretion in the goldfish: possible sex steroid Feedback Mechanics. **J. Neuroendocrinol.** **5**: 129-136.

Trudeau, V.L.; Sioley, B.D.; Peter, R.E. (1993) GABA stimulation of Gonadotropin-II release in Goldfish: Involvement of GABA Receptors, Dopamine, and sex steroids. **Regulatory Integrative Comp. Physiol.** **34**: R348-R355.

Trudeau, V.L.; Sioley, B.D.; Wong, A.O.L.; Peter, R.E. (1993) Interactions of Gonadal Steroids with Brain Dopamine and Gonadotropin-Releasing Hormone in the Control of Gonadotropin-II Secretion in the Goldfish. **Gen. Comp. Endocrinol.** **89**: 39-50.

Wong, A.O.L.; Chang, J.P.; Peter, R.E. (1992). Dopamine Stimulates Growth Hormone Release from the Pituitary of Goldfish Carassius auratus, through the Dopamine D1 Receptors. **Endocrinol.** **130** (3): 1201-1210.

Wong, A.O.L.; Chang, J.P.; Peter, R.E. (1993) "In vitro" and "in vivo" Evidence that Dopamine Exerts Growth-Releasing Activity in Goldfish. **American Physiol. Society**: E925-E932.

Yu, K.L.; Peter, R.E. (1990) Alterations in Gonadotropin-Releasing Hormone Immunoactivities in Discrete Brain Areas of Male Goldfish During Spawning Behavior. **Brain Research.** **512**: 89-94.

Yu K.L. Peter R.E. (1990) Dopaminergic Regulation of Brain Gonadotropin-Releasing Hormone in Male Goldfish during Spawning Behavior. **Neuroendocrinology** **52**, 276-283.

Yu K.L. Rosenblum P.M. Peter R.E. (1991) "In vitro" Release of Gonadotropin-Releasing Hormone from the Brain Preoptic-Anterior Hypotalamic Region and Pituitary of Female Goldfish. **General and**

**Comparative Endocrinology 81, 256-267.**

Yu, K.L.; Peng, C.; Peter, R.E. (1991) Changes in Brain Levels of Gonadotropin-Releasing Hormone and Serum Levels of Gonadotropin and Growth Hormone in Goldfish during Spawning. **Can. J. Zool. 69:** 182-188.

Yu, K.L.; Peter, R.E. (1992) Adrenergic and Dopaminergic Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Release from Goldfish Preoptic-Anterior Hypothalamus and Pituitary "in vitro". **Gen. Comp. Endocrinol. 85:** 138-146.