



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

## “Valoración Histológica del Efecto de la Reserpina Sobre las Células Gonadótropas de Carpa Común (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 :

LILIAN GONZALEZ SEGURA

DIRECTOR DE TESIS:

BIOL. RODOLFO CARDENAS REYGADAS

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1994



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.

A tí **DIOS**, por sentir siempre tu presencia  
cerca de mí, por iluminar mi camino, por  
ser tan generoso; ésto es solo un poquito  
de lo mucho que siempre me has dado.

A mis padres RAMON y EMELIA  
A mi hermana IVONNE, a mi cuñado FELIPE  
A mis sobrinos TANIA y FRANCISCO  
A tí ATALO.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mi director de tesis **Biól. Rodolfo Cárdenas Reygadas**, por su asesoramiento, dedicación, tiempo, amistad y apoyo que me ha brindado a lo largo de la elaboración de este trabajo.

Al **Biól. José del Carmen Benitez**, por su asesoramiento académico, colaboración en el trabajo fotográfico y por su paciencia.

Al **Dr. Luis Arturo Baiza Gutman**, por sus comentarios durante la revisión de este trabajo y por sus valiosas aportaciones.

Al **M. en C. Martín Palomar Morales**, por la revisión del presente trabajo.

A la **Biól. Carmen Alvarez Rodríguez**, por su amistad y esmero en la revisión de este trabajo.

Al **Prof. Raúl Gallardo** por sus valiosas aportaciones en la realización de las pruebas estadísticas.

Al **Dr. Cervantes** y a todo el personal del Laboratorio de Anatomía Animal Comparada por las facilidades brindadas para el mantenimiento de los organismos utilizados en este trabajo.

A la **Biól. Rosario González Valle** por su ayuda en la elaboración de gráficos, así como en el procesamiento de las muestras.

A la **Biól. Rocío García Bores** por su ayuda, apoyo y amistad brindada durante la elaboración del presente trabajo.

A todos los compañeros del Laboratorio de Histología.

A mis amigos **Alicia Ochoa S., Ivonne Olivares C., Arturo Lozano R., Martha Manina Flores S., Candelaria Velázquez G., Abigail Flores O. y Claudia Santamaría R.** por su apoyo.

A mis amigos que me ayudaron a conseguir los organismos para la realización del presente trabajo.

A la madre **Magdalena** por haberme enseñado unas bases firmes, tanto en el aspecto profesional como en lo moral.

De forma muy especial para **mis padres, mi hermana, mi cuñado y mis sobrinos** por su cariño, confianza, comprensión, consejos y por su diario apoyo, ya que con la ayuda de ustedes he podido llegar a alcanzar una de mis metas.

Al **Ing. Atalo de Santillana Verdín** por sus atinados consejos, comprensión, amor y apoyo en todos los aspectos.

A todos los profesores que influyeron en mi formación como Bióloga y a todas las personas que de una u otra manera participaron en la elaboración de este trabajo.

**GRACIAS**

**LILIAN GONZALEZ SEGURA.**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Histología, de la Unidad de Morfología y Función (UMF) de la UNAM, Campus Iztacala, U.N.A.M. bajo el asesoramiento del Biól. Rodolfo Cárdenas Reygadas.

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
JUSTIFICACION.....	22
OBJETIVOS.....	23
METODOLOGIA.....	24
RESULTADOS.....	29
DISCUSION .....	46
CONCLUSIONES.....	52
ANEXOS.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	57

## RESUMEN

Estudios con fármacos antidopaminérgicos han demostrado ser efectivos para estimular la espermiación y la ovulación en diversas especies de peces teleósteos. La reserpina, fármaco que depleta a la dopamina ha mostrado que estimula la espermiación en la carpa, si bien éste ha sido utilizado experimentalmente, se desconoce su influencia sobre el sistema hipofisiario, por lo cual el presente trabajo contribuye al conocimiento del efecto de la reserpina sobre la hipófisis. El objetivo del presente trabajo fue valorar histológicamente el efecto de la reserpina sobre el número y volumen de las células gonadotropas de carpa común (Cyprinus carpio). La metodología consistió en un bioensayo con carpas Cyprinus carpio machos. A los grupos experimentales se les aplicaron diferentes dosis de reserpina (0.5, 1 y 1.5 mg/Kg de peso), por medio de inyecciones intraperitoneales. Después de 48h de la última inyección todos los organismos fueron sacrificados, disectándoles las gónadas para ser procesadas por técnica histológica de rutina y teñidas con hematoxilina-eosina. Por otra parte, también se les extrajo la hipófisis, las cuales fueron fijadas, procesadas y teñidas por la técnica de Jafri (1979). El conteo de las células gonadotropas se realizó por microscopia óptica y la evaluación del volumen de dichas células se llevó a cabo con un ocular micrométrico a 100x. Los resultados del número aproximado de células gonadotropas indican que los grupos experimentales presentaron un aumento significativo ( $p < 0.05$ ), con respecto a los grupos control y testigo, mientras que el volumen de las células gonadotropas de los grupos experimentales con dosis de 0.5 y 1 mg/Kg de peso presentaron un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto a los grupos control, testigo y experimental (1.5 mg/Kg de peso). Por otra parte los I.G.S. no presentaron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Estos resultados nos muestran que la reserpina provoca un aumento sobre el volumen de las células gonadotropas y que al igual que en el número de las mismas, la dosis que produce un mayor efecto es la de 1 mg/Kg de peso. El efecto de la reserpina se puede explicar debido a que un mayor número de células gonadotropas se encuentra liberada de los efectos de la dopamina, en consecuencia éstas puedan sintetizar más GtH(s), acumularla temporalmente en su citoplasma y provocar un aumento en su volumen. Por otra parte, al encontrarse los niveles de GtH(s) elevados, éstos podrían ocasionar que se estimulara la secreción de esteroides sexuales, los cuales podrían tener un efecto de retroalimentación positiva sobre el desarrollo de las células gonadotropas, ocasionando también un aumento en su mitosis y en la secreción de GtH(s). Las gónadas de los grupos experimentales presentan una mayor abundancia de estados avanzados de espermatogénesis (espermatozoides), mientras que en los grupos control y testigo se encuentran diferentes categorías celulares que van desde espermatocitos primarios hasta espermatozoides. Por lo que podemos concluir que la reserpina causa un incremento significativo en el número de las células gonadotropas, en su volumen, lo que es paralelo a que la actividad gonadal de la carpa común Cyprinus carpio se vea favorecida en el testículo.

## INTRODUCCION

Existen dos sistemas de información importantes en los vertebrados: los sistemas nervioso y endócrino, los cuales son interdependientes y a menudo actúan juntos formando el sistema neuroendócrino, el cual es fundamental para el control de la reproducción (Espinosa y Labarata, 1986).

La conducta reproductiva de muchos peces está influenciada por los sentidos a través de la percepción de los cambios del ambiente que aparecen cuando se aproxima la primavera. Los órganos de los sentidos reciben estímulos físicos y químicos del ambiente. Los cambios físicos en el flujo del calor o del tacto son percibidos a través de los receptores de la piel; los estímulos visuales implican cambios en la intensidad y cualidad de la luz; y los acústicos son recibidos a través del oído interno o de la línea lateral. Los estímulos químicos son los que se experimentan a través de los órganos del olfato y del gusto (Lagler et al., 1984).

Una vez que los estímulos físicos y químicos del ambiente son traducidos al hipotálamo se modifica la producción y liberación de las hormonas hipotalámicas que, en peces son transportadas a través de los axones neurales a la hipófisis, donde estimularán la liberación de gonadotropinas al torrente circulatorio. Las gonadotropinas actúan sobre las gónadas para inducir la gametogénesis y la producción de esteroides, los cuales influyen sobre el crecimiento gonadal, la maduración y la puesta (Peter et al., 1990).

El entendimiento de estos mecanismos ha permitido aumentar artificialmente la eficiencia de dichos procesos en especies en peligro de extinción y en especies de valor comercial (Espinosa y Labarata, 1986).

Una de las glándulas clave para el control hormonal de la reproducción es la hipófisis. Muchos procesos fisiológicos están influenciados directa o indirectamente por sus secreciones (Eckert et al., 1990). La hipófisis es una glándula en la que se realizan la síntesis, el almacenaje y la liberación de varias hormonas peptídicas (Eckert et al., 1990).

Las hormonas de la hipófisis de los peces pueden ser divididas en dos grupos, uno que controla la función de otras glándulas endócrinas y el otro que influye en procesos enzimáticos selectos en uno o varios tipos de células somáticas.

En el primer grupo se encuentran la hormona **adrenocorticotrópica**, cuya función es directa en el tejido productor de hormonas de la corteza adrenal, tiene también un efecto estimulante en la producción de melanina en el pez dorado (Carassius auratus); la **tirotrópica**, la cual controla la secreción tiroidea y la **gonadotrópica** que mantiene las funciones gonadales (Lagler et al., 1984).

En el segundo grupo hay varias hormonas como la **melánica (MAH)** que actúa sobre las células portadoras de melanina de la piel; la **estimuladora de los melanóforos (MSH)** que actúa antagónicamente a la hormona melánica y expande el pigmento en las células de color, esta hormona sintetiza posteriormente melanina; la **prolactina** que está implicada en la regulación electrolítica en los teleósteos y en la melanogénesis junto con la hormona estimuladora de los melanóforos y la del

**crecimiento** que promueve el crecimiento en longitud del cuerpo de los peces (Lagler et al., 1984).

La hipófisis es de suma importancia en el sistema endócrino, se encuentra localizada en la base del diencéfalo, por detrás del quiasma óptico y por delante del saco vasculoso. Es un órgano que ontogénicamente tiene dos orígenes: por una parte, la invaginación del proceso ventral del diencéfalo, formará a la neurohipófisis o lóbulo nervioso; y por otra, la invaginación ectodérmica (bolsa de Rathke) del techo de la cavidad bucal embrionaria, dará lugar a la adenohipófisis (Peter, et al., 1990).

La neurohipófisis está formada principalmente por fibras nerviosas axonales amielínicas que se originan en los núcleos hipotalámicos. Contiene un tallo, que es una extensión de tejido por abajo del tercer ventrículo, por el cual pasan las fibras axonales de las células neurosecretoras y un engrosamiento o lóbulo neurohipofisiario que aloja las terminaciones nerviosas (Espinosa y Labarata, 1986).

La neurohipófisis se diferencia regionalmente en dos partes: la parte nerviosa y la eminencia media. Esta última tiene irrigación sanguínea común con la pars distalis de la adenohipófisis. La parte nerviosa tiene una irrigación sanguínea independiente de la pars distalis. Los teleósteos carecen de eminencia media en el sentido clásico y, por tanto, no poseen un sistema portal externo dirigido a la hipófisis (Espinosa y Labarata, 1986).

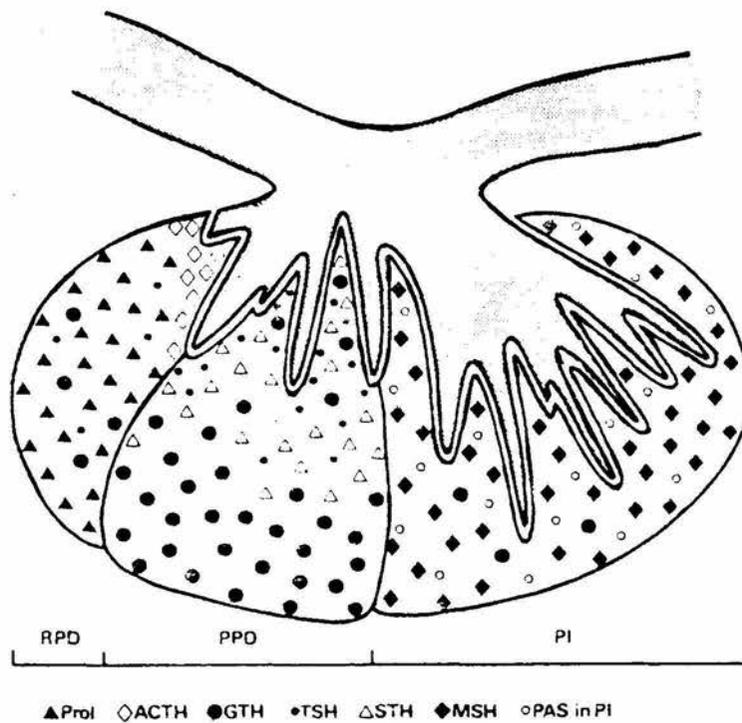
El suministro de sangre a la neurohipófisis está basado en una o dos arterias hipofisiarias, las cuales proveen de sangre a sus regiones anterior y posterior, y a la adenohipófisis; un plexo primario de capilares se forma primero en el tejido de la

neurohipófisis y desemboca a una serie de capilares (plexo secundario) que pasa dentro de la hipófisis y vasculariza las células endócrinas. Las terminales neurosecretoras no han sido observadas en los plexos capilares primarios. En algunas especies de teleósteos existe un sistema portahipofisiario vestigial, pero las neurosecreciones finales no terminan en el plexo capilar primario. La entrega funcional de neurohormonas a la adenohipófisis es por terminales neurosecretoras que han invadido al tejido (Peter et al., 1990).

En la adenohipófisis se pueden reconocer tres lóbulos: uno rostral o "pars distalis rostral" (PDR), otro más caudal o "pars distalis proximal" (PDP) y un lóbulo intermedio o "pars intermedia" (PI), que se haya en contacto estrecho con la neurohipófisis (Peter et al., 1990).

Existen diferentes categorías celulares en los lóbulos hipofisarios de los peces teleósteos, distinguibles por su morfología, sus propiedades tintoriales, sus reacciones inmunológicas y su función (Espinosa y Labarata, 1986; Peter et al., 1990).

La pars distalis rostral contiene células lactotropas, mientras que las corticotropas están localizadas a lo largo del borde entre la pars distalis rostral y la pars distalis proximal. Las tiotropas, en algunas especies de teleósteos están repartidas en la pars distalis rostral, pero pueden encontrarse también entre la pars distalis rostral y la pars distalis proximal o en ambas partes o sólo en esta última; la pars distalis proximal contiene principalmente células gonadotropas y somatotropas (Peter et al., 1990). La distribución de estas células se puede observar en forma esquemática en la Fig. No. 1.



**FIGURA 1.** Representación esquemática de una sección sagital de pituitaria de un teleosteo mostrando la distribución de los tipos celulares en la adenohipófisis (Prol, células que producen prolactina; ACTH, corticotropas; GTH, gonadotropas; TSH, células tirotropas; STH, somatotropas; MSH, melanotropas; PAS, células Schiff-positivas; RPD, pars distalis rostral; PPD, pars distalis proximal; PI, pars intermedia; área gris, neurohipófisis. (Van Oordt, P. G. W. y Peute J., 1983).

De acuerdo a sus propiedades tintoriales ante determinados colorantes se distinguen las siguientes categorías celulares:

1. **Cromófobas;** células que no se tiñen o lo hacen muy poco, se observan transparentes o blancas en los cortes histológicos. Existen tres subpoblaciones de cromófobas: a) las células no secretoras indiferenciadas, que pueden ser células madres, b) cromófilas parcialmente degranuladas, que contienen escasos gránulos y

c) foliculares, el tipo cromófoba predominante, que forman una red de estroma que sostiene a otras células (Douglas, F. P., 1991).

2. **Cromófilas;** son células secretoras de hormona de la adenohipófisis, se tiñen de forma intensa debido a los grandes gránulos secretorios citoplasmáticos en los que se almacenan sus hormonas. Se dividen en dos clases: a) acidófilas; no contienen glicoproteínas ni grupos ácidos fuertes. Reaccionan con eosina, naranja G y/o eritrosina. Son más abundantes en la periferia de la glándula, por lo general son más grandes y más numerosos; a este grupo pertenecen las células lactotropas, que secretan prolactina y las somatotropas, secretoras de la hormona del crecimiento. b) basófilas, que poseen glicoproteínas y grupos ácidos fuertes que reaccionan específicamente con el ácido periódico de Schiff (PAS), el azul alciano (AB) y el aldehído-fucsina (AF). Son más abundantes en el centro de la glándula, por lo general son más grandes que las acidófilas, con menor número de gránulos más pequeños. En este grupo están integradas las células gonadotropas, secretoras de gonadotropinas (GtH); las células tirotropas, que secretan hormona estimulante de la tiroides; las células corticotropas, secretoras de la hormona adrenocorticotrópica; y las células melanotropas, que producen la hormona estimulante de los melanocitos (Douglas, F. P., 1991).

La adenohipófisis produce las hormonas gonadotropas, que mantienen las funciones gonadales. La actividad de las células productoras de gonadotropinas está regulada por neurohormonas de origen hipotalámico y por las hormonas de origen gonadal. Las células productoras de gonadotropinas tienen una posición importante en la cadena de estructuras que sirven para asegurar la reproducción y la continuidad de las especies (Espinosa y Labarata, 1986).

En los peces teleósteos las células gonadotropas, generalmente se localizan en la parte ventral de la pars distalis proximal, pero en épocas de mayor actividad pueden estar invadiendo periféricamente a la pars intermedia o a otras regiones de la pars distalis proximal (Peter, et al., 1990).

Las investigaciones histofisiológicas han permitido estudiar los cambios observados en el hipotálamo y asociarlos con las modificaciones encontradas en las células adenohipofisarias, atendiendo al tamaño y forma, tanto de las células como de los núcleos, a los aspectos funcionales (almacenaje, liberación), a las variaciones tanto cuantitativas de orgánulos como el retículo endoplásmico, aparato de Golgi o mitocondrias (Carrillo, 1977; Van Oordt y Peute, 1983). Las técnicas inmunocitoquímicas han permitido asociar a cada uno de estos tipos celulares con la hormona que posiblemente secretan (Cambre et al., 1986).

La inmunocitoquímica es la herramienta más importante y la más actual en la identificación de las células gonadotropas. Los primeros estudios de identificación inmunocitoquímica en peces corresponden a McKeown y Van Overbeeke (1971), quienes, mediante anticuerpos contra la LH y la FSH ovinas, observaron que en la pars distalis proximal del salmón "sockeye" (Oncorhynchus nerka) había una categoría celular que presentaba reacción ante los anticuerpos anti-LH, pero no ante el anti-FSH, Billard et al., (1971) corroboraron estos resultados en el mismo salmón (Oncorhynchus nerka), encontrando una respuesta diferente en la carpa común (Cyprinus carpio), en la que todas las células basófilas de la pars distalis proximal, sin excepción reaccionaban ante el anti-LH.

La forma más correcta de estudiar a las células gonadotropas es correlacionando los resultados de la histofisiología con los de la inmunocitoquímica (Cambre, et al., 1986).

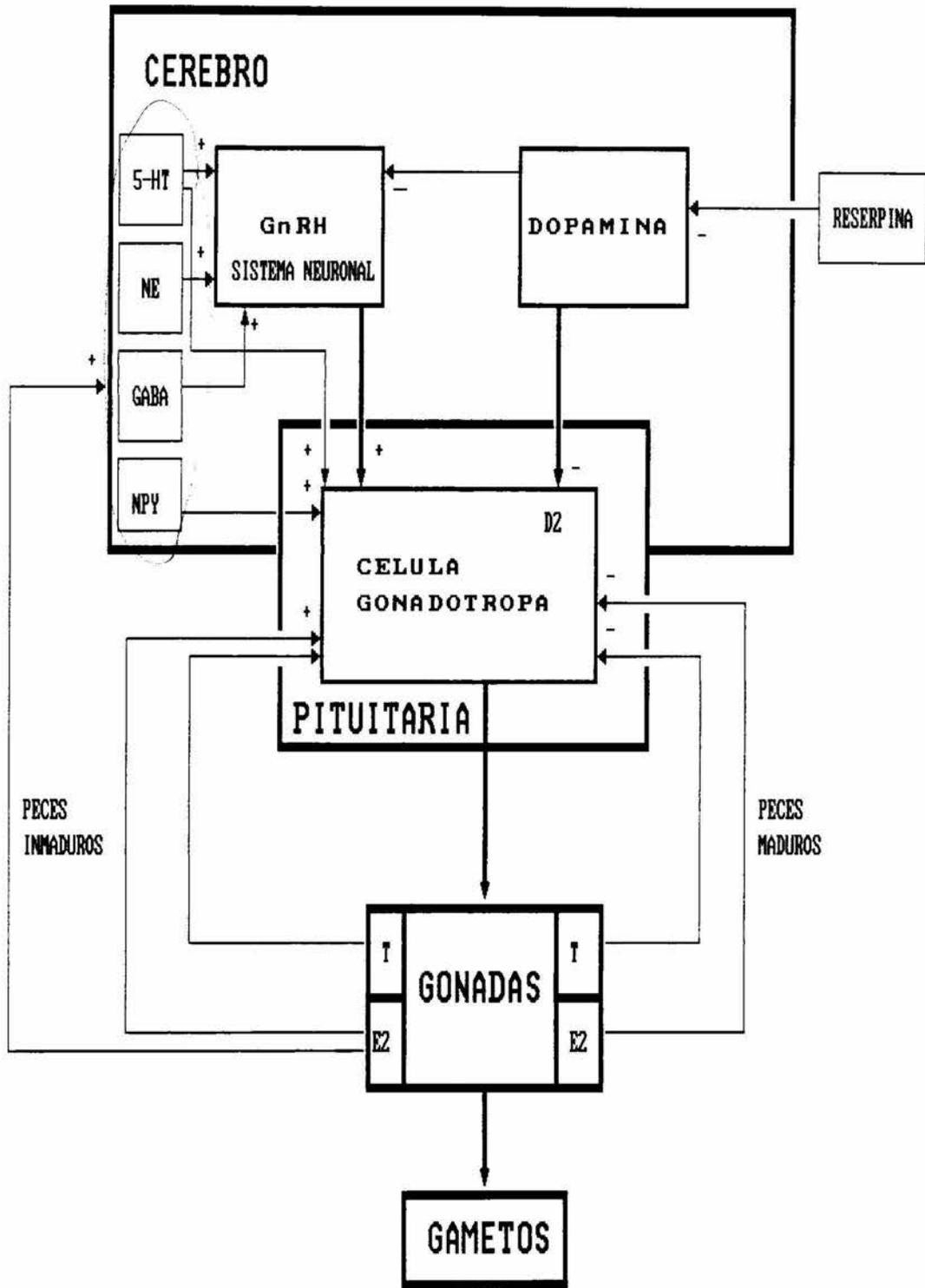
Desde que se iniciaron los primeros estudios en la hipófisis de los teleósteos, los diferentes autores han especulado la posibilidad de que existan uno, dos o más tipos de células gonadotropas.

En el pez dorado (Carassius auratus) se pudo observar que coexisten dos tipos de células (tipo I y tipo II) (Dobourg et al., 1985). Esto ha sugerido que ambos tipos celulares podrían estar involucrados en la secreción de gonadotropinas, pero no descartan la posibilidad de que estas dos categorías celulares representen dos estados fisiológicos diferentes de un mismo tipo celular, hecho observado por Kah (1986).

Por medio de técnicas inmunocitoquímicas se pudo demostrar la existencia de dos gonadotropinas GtH I y GtH II, secretadas por dos diferentes tipos celulares en la hipófisis de la trucha arcoiris (Salmo gairdieri irideus) (Nozaki et al., 1990 a y b).

El la Fig. No. 2 podemos observar un modelo esquemático de la regulación neuroendócrina de la liberación de gonadotropinas en peces teleósteos.

La secreción de gonadotropinas en peces teleósteos está regulada por la acción estimuladora de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y por la acción inhibitoria de la dopamina (DA) (Omeljaniuk et al., 1989; Peter., 1983).



**FIGURA 2.** Modelo de regulación neuroendócrina en peces teleósteos. La secreción de gonadotropinas está regulada por las acciones estimulatorias (+) de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y por la acción inhibitoria (-) de la dopamina. La dopamina actúa bloqueando el efecto de la GnRH y sobre las células gonadotropas a nivel de receptores D2. La norepinefrina (NE) y el ácido- $\gamma$ -aminobutírico (GABA), favorecen la liberación de GnRH. El neuropéptido Y (NPY) y la serotonina (5-HT), estimulan la secreción de GtH en las células gonadotropas, además esta última también induce la liberación de GnRH. Las gonadotropinas (GtH) actúan directamente sobre las gónadas, estimulando la producción de esteroides sexuales y gametos. Los esteroides sexuales como la testosterona (T) y el estradiol (E2) tienen una acción de retroalimentación positiva o negativa, dependiendo del estado de madurez de los peces. El estradiol puede bloquear los efectos estimulatorios de el GABA (Peter et al., 1991).

La dopamina actúa a dos niveles, directamente sobre las células gonadotropas inhibiendo la liberación espontánea de GtH y por otro lado indirectamente bloqueando el efecto de GnRH sobre la liberación de GtH (Peter., 1983; Omeljaniuk et al., 1989).

La posibilidad de una acción directa sobre las células productoras de gonadotropina está apoyada por el hecho de que la apomorfina, agonista inespecífico de la dopamina, inhibe la liberación espontánea de GtH en células gonadotropas de hipófisis cultivadas *in vitro* (De Leuw et al., 1984).

También se ha demostrado que la acción inhibitoria de la dopamina es a nivel de receptores D2 en las células gonadotropas, ya que cuando se agregan al cultivo sustancias como el agonista SKF38393, cuya acción es mediada por receptores D1, no se inhibe su secreción basal o en respuesta a estimuladores (Omeljaniuk et al., 1987, Van Asselt et al., 1988).

Se han utilizado antagonistas dopaminérgicos en combinación con análogos de la GnRH en especies como el pez dorado (Chang and Peter, 1983; Chang et al., 1984b, ; Sokolowska et al., 1985; Sloley et al., 1991) y la carpa común (Sokolowska et al., 1988), obteniendo un aumento en los niveles plasmáticos de gonadotropinas, así como en la ovulación y la espermiación.

Otras sustancias influyen en la secreción de gonadotropinas actuando a diferentes niveles, tal es el caso de la norepinefrina (NE) (Chang et al., 1984) y la 5-hidroxitriptamina serotonina (5-HT) que estimulan la liberación de GnRH en el pez dorado (Carassius auratus). En estudios *in vitro* se ha demostrado que la serotonina, ejerce una acción directa sobre las células gonadotropas del pez dorado (Carassius

auratus) ocasionando una acción estimuladora sobre la secreción de GtH (Somoza et al., 1988 y 1991).

In vitro el neuropéptido Y (NPY) puede actuar directamente sobre las células gonadotropas para inducir la secreción de gonadotropinas en el pez dorado (Carassius auratus) (Kah et al., 1989; Peng et al., 1990) y en la trucha arcoiris (Salmo gairdneri R.) (Danger et al., 1991).

Después de que las gonadotropinas son secretadas, éstas actúan directamente sobre las gónadas (testículo y ovario), estimulándolas para producir gametos y esteroides que ayudarán tanto a los procesos de gametogénesis, como a establecer las características sexuales secundarias (Harvey y Hoar, 1980).

En la mayoría de los peces teleósteos, los testículos son dos órganos pares, alargados y unidos por la parte dorsal a la cavidad corporal. Según las especies, la estructura testicular varía, siendo los dos tipos más comunes: el lobular y el tubular. La mayor parte de los teleósteos poseen testículos con arreglo túbulo-cístico, caracterizado por tener túbulos seminíferos con cistos, que son grupos de células de los diferentes estadios de la espermatogénesis (Carrillo, 1977; Billard et al., 1982).

El testículo de los teleósteos posee una parte germinal y una parte intersticial. La primera contiene dos tipos celulares: las células germinales y las células de Sertoli. La segunda posee células intersticiales, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos y células de Leydig (Espinosa y Labarata, 1986).

En el testículo de los teleósteos existen varios tipos de espermatogonias, de acuerdo al estado de madurez sexual. En general, las primeras generaciones de

espermatogonias se identifican por las tallas del núcleo y de los cistos. Los espermatocitos, pasan por las fases de leptonema, zigonema, paquinema y espermatocitos secundarios, distinguiéndose entre sí por el tamaño y el aspecto nuclear adoptado como consecuencia de las modificaciones cromosómicas que tienen lugar. Los espermatocitos secundarios son los obtenidos tras la segunda división de maduración y se distinguen por el aspecto contraído de sus cromosomas y por su tamaño (Espinosa y Labarata, 1986).

Los espermatocitos secundarios dan lugar a las espermátides. La transformación de éstas en espermatozoides maduros o espermiogénesis consiste en la reorganización del núcleo y del citoplasma, junto con el desarrollo total del flagelo. Los espermatozoides están solamente presentes durante la época de puesta, o como elementos residuales de la post-puesta. Son elementos de menor tamaño que cualquiera de las clases de espermátides y se les encuentra libres en la luz lobular (Billard, 1979).

Las gonadotropinas actúan directamente sobre las gónadas, estimulando la producción de gametos y de esteroides sexuales (Harvey y Hoar, 1980). En experimentos con la trucha arcoiris (Salmo gairdneri R) (Bommelaer et al., 1981), el pez gato africano (Habibi et al., 1989) y el pez dorado (Carassius auratus) (Kobayachi y Stacey 1990; Billard y Peter 1977) se ha demostrado que la testosterona (T) y el estradiol (E2) tienen una acción de retroalimentación negativa a nivel de la hipófisis,

En otros estudios, se ha demostrado que los esteroides sexuales (testosterona y el estradiol) ejercen efectos positivos sobre la secreción de GtH en

truchas arcoiris (Salmo gairdneri) hembras y machos inmaduros (Crim y Evans 1979).

En un estudio con fragmentos de hipófisis de pez dorado (Carassius auratus) se comprobó que el ácido- $\gamma$ -amino-butírico (GABA) tiene un efecto estimulador en la liberación de GnRH, causando un aumento en los niveles séricos de GtH (Kah et al., 1991). El GABA puede estar influenciado por el estradiol, el cual puede provocar la reducción de su concentración en el cerebro, lo que evita sus efectos estimuladores sobre los niveles de GtH - II en el suero (Peter, et al., 1991).

La influencia de las catecolaminas en la liberación de hormonas en las hembras del pez dorado fue estudiada por Chang et al., (1985). En estos peces, la dopamina y la apomorfina pueden estimular la liberación de la hormona del crecimiento (GH).

La dopamina también regula la secreción de la GH. En células de hipófisis del pez dorado cultivadas *in vitro*, se demostró que la dopamina ejerce una acción estimuladora en la secreción de GH a través de los receptores D1 (Chang et al., 1990).

El tratamiento de pez dorado (Carassius auratus) con dietilditio carbamato (DDC), fármaco que bloquea la conversión de dopamina a norepinefrina ocasiona una disminución significativa en los niveles de GnRH en el telencéfalo y el hipotálamo. Tratamientos en el mismo pez con  $\alpha$ -metil-p-tirosina ( $\alpha$ MPT), que bloquea la conversión de tirosina a L-Dopa y consecuentemente la síntesis de catecolaminas causaron un aumento en los niveles de GnRH significativo sólo en el bulbo olfatorio (Peter et al., 1990).

La inyección del aminoácido neurotransmisor taurina en el pez dorado (Carassius auratus) causó una elevación en los niveles séricos de GtH - II. La síntesis del inhibidor de catecolaminas  $\alpha$ -metil-p-tirosina causa la depleción de las concentración de dopamina en la pituitaria y eleva los efectos de la taurina sobre los niveles de GtH - II en suero, lo cual sugiere que la taurina podría actuar modulando los efectos inhibitorios de la dopamina sobre la liberación de GtH - II (Kah et al., 1991).

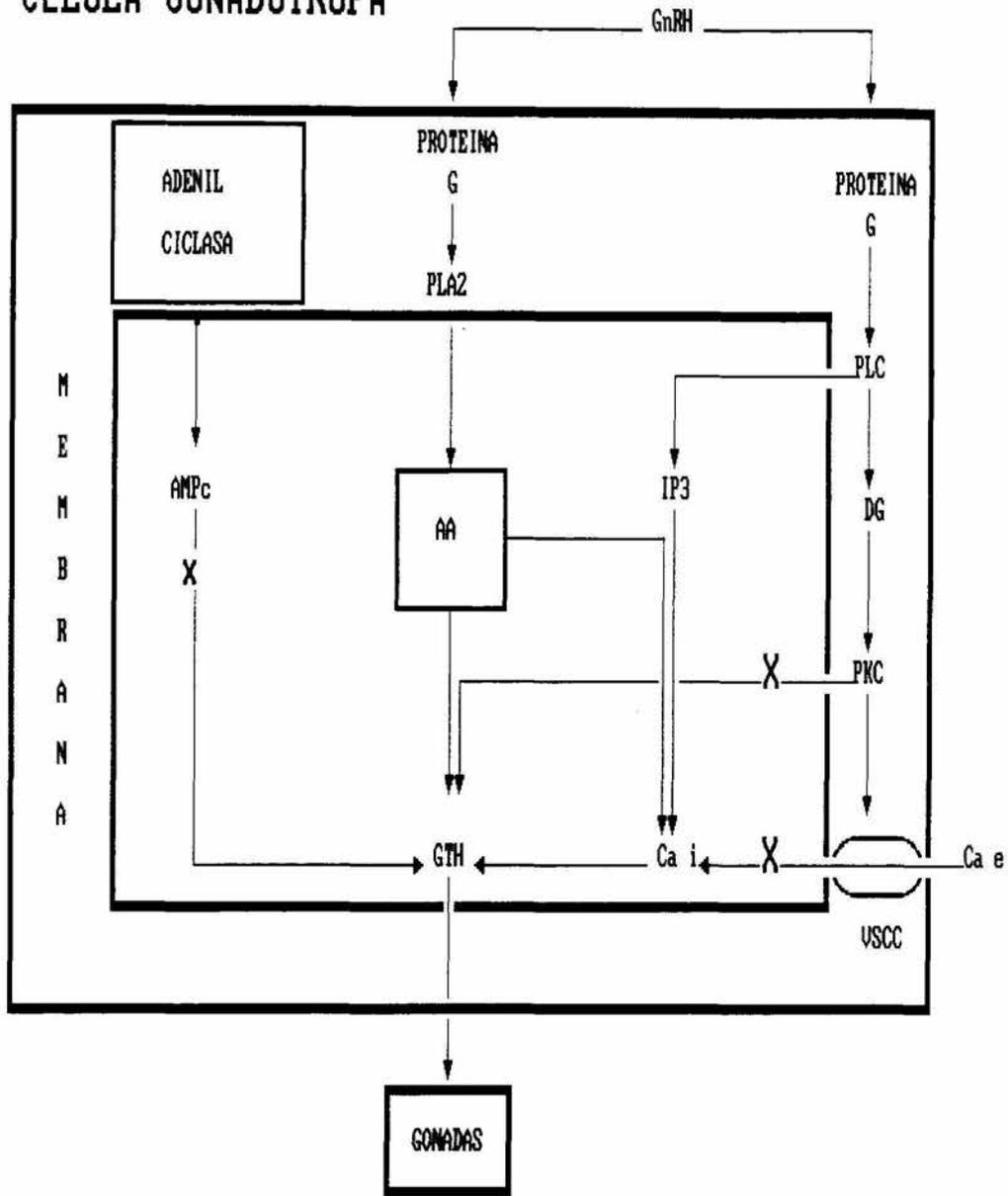
Existen mecanismos intracelulares que median la acción de las sustancias que regulan la secreción de gonadotropinas; entre los cuales se encuentran: el metabolismo del  $Ca^{2+}$ , la proteína cinasa C, el AMPc y el ácido araquidónico (Chang et al., 1989, 1991 y 1993; Jobin y Chang, 1992).

En la Fig. 3 podemos observar un modelo esquemático que representa los mecanismos intracelulares implicados en la secreción de gonadotropinas regulada por diversas sustancias.

En células dispersas de la pituitaria del pez dorado (Carassius auratus) se ha comprobado, que la adenil ciclasa aumenta la producción de AMPc estimulando la liberación de GtH (Chang et al., 1992).

In vitro se ha demostrado que la aplicación de fosfolipasa A2 (PLA2) y de ácido araquidónico (AA) también incrementan la liberación de GtH (Chang et al., 1989 y 1991).

# CELULA GONADOTROPA



**FIGURA 3.** Modelo esquemático de los mecanismos intracelulares que median la liberación de GtH. La adenilil ciclasa cataliza la producción de AMPc. La acción de GnRH activa a la fosfolipasa A2 (PLA2), lo que provoca la movilización del ácido araquidónico (AA). Por otra parte la GnRH probablemente también está asociada al mecanismo de fosfolipasa C (PLC) generando fosfatos de inositol (IP3) y diacilglicerol (DG), los que participan en la movilización del calcio intracelular (Ca<sup>i</sup>) y activan a la proteína cinasa C (PKC), la cual estimula la entrada de calcio extracelular (Ca<sup>e</sup>) a las células gonadotropas a través del canal de calcio dependiente del voltaje (VSCC). El AMPc, el AA y el Ca<sup>i</sup>, provocan la liberación de GtH. X, posible sitio bloqueado por la dopamina (Chang et al., 1993).

✓ La estimulación de GnRH probablemente esté asociada al mecanismo de la fosfolipasa C (PLC). La acción de esta enzima genera fosfatos de inositol (IPs), los que participan en la movilización del calcio intracelular  $[Ca]_i$ , y diacilglicerol (DG), que activa a la proteína cinasa C (PKC). La activación de la PKC estimula la entrada de calcio extracelular  $[Ca]_e$  a través del canal de calcio dependiente del voltaje (VSCC). El que promueve la entrada de  $[Ca]_e$  a las células gonadotropas, una vez que se aumenta el  $[Ca]_i$ , se libera la GtH (Jobin y Chang, 1992).

La inhibición provocada por la dopamina en las células gonadotropas puede ser debido al bloqueo de los mecanismos mediadores a nivel de la movilización de  $[Ca]_i$ , por acción a la proteína cinasa C (PKC) o por los componentes dependientes del AMPc (Chang et al., 1993).

En el pez dorado y la perca se ha demostrado que drogas que bloquean la ✓ síntesis de dopamina como pimozida, domperidona, espiperona y metocloramida (Omeljaniuk et al., 1989; Peter et al., 1988) o que depletan a las catecolaminas como la reserpina (Sokolowska et al., 1988) son también medios efectivos para lograr la inducción de la madurez gonadal.

En el pez dorado (Carassius auratus) el pimozida inyectado en combinación con análogos de LH-RH ha mostrado ser un medio efectivo para la inducción de espermiación y ovulación, sus efectos fueron más importantes en peces maduros que en otros con regresión o recrudescencia gonádica. En este estudio se pudo confirmar que hay una variación en la respuesta al pimozide, la cual puede deberse a las diferencias en el contenido de GtH en la pituitaria, la habilidad de la glándula para sintetizar GtH, el número de receptores para la dopamina y la GnRH, o a la combinación de estos diferentes factores (Sokolowska et al., 1985).

En la carpa común (Cyprinus carpio) se han analizado los efectos de la reserpina en combinación con análogos de la GnRH en la espermiación y ovulación. Este fármaco inyectado intraperitonealmente en una dosis de 1mg/Kg aumenta los niveles plasmáticos de gonadotropinas. Así mismo, al ser inyectado con análogos de la GnRH se obtuvieron niveles mayores de gonadotropinas en relación con los organismos que únicamente fueron inyectados con reserpina (Sokolowska et al., 1988).

La reserpina es un alcaloide obtenido de la raíz de algunas especies de Rauwolfia, principalmente de Rauwolfia serpentina. Depleta los depósitos de noradrenalina en los tejidos periféricos y de noradrenalina, dopamina y serotonina en el sistema nervioso central. La depleción empieza 1 hora después de la administración de reserpina y es máxima a las 24 horas; desaparece lentamente, por lo cual las dosis repetidas tienen un efecto acumulativo. La droga interfiere con la entrada de monoaminas a los depósitos intracelulares, aparentemente inhibiendo en forma irreversible el mecanismo de captación dependiente de ATP y magnesio (Rodríguez, 1984).

La reserpina interfiere en el almacenamiento intracelular de las catecolaminas. La disminución de la síntesis de norepinefrina inducida por la reserpina puede deberse al bloqueo de la captación de la dopamina por los gránulos de almacenamiento que contienen la enzima dopamina beta-hidroxilasa (Drill, 1978).

La reserpina afecta algunas funciones hipotalámicas en mamíferos relacionadas con la liberación de hormonas hipofisarias; aumenta la secreción de

hormona adrenocorticotrópica y de prolactina e inhibe la producción de gonadotropina (Rodríguez, 1984).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La secreción de gonadotropinas en peces teleósteos está regulada por las acciones estimuladoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y por la acción inhibitoria de la dopamina (DA). En diferentes experimentos se ha demostrado que la reserpina, fármaco que depleta a la dopamina, aumenta la actividad de las células gonadotropas, las cuales sintetizan mayor cantidad de GtH. De acuerdo a lo anterior podríamos esperar que el al aplicar reserpina a carpas su efecto se vería reflejado en el incremento del volumen de las células gonadotropas. Por otra parte al existir una mayor cantidad de gonadotropinas, se van a estimular las gónadas para producir esteroides sexuales y gametos. Es posible que dichos esteroides puedan actuar directamente sobre las células gonadotropas, teniendo efectos de retroalimentación positiva, tanto en la liberación de gonadotropinas, así como en su desarrollo, ocasionando posiblemente que estas células se reproduzcan, lo cual nos lleva a pensar que el efecto de la reserpina se podría reflejar de forma indirecta en un aumento en el número de estas células.

## JUSTIFICACION

La necesidad del hombre de cultivar organismos acuáticos con el fin de incrementar las fuentes proteicas, ha propiciado el desarrollo de la piscicultura y de la investigación en el campo de la reproducción de peces, como la estimulación a la maduración gonadal, la inducción a la puesta, la producción de crías, el mejoramiento genético, la preservación de gametos y la mejoría de los sistemas de fertilización.

En el aspecto de inducción a la puesta y la estimulación a la maduración gonadal se han desarrollado varios métodos utilizados a nivel mundial, entre los cuales podemos mencionar:

La administración de extractos hipofisarios de mamífero (Peter et al., 1985) y de pez (Houssay, 1931). La aplicación de decapeptidos hipotalámicos y sus análogos, los cuales aumentan la secreción de gonadotropina (s), siendo el precio alto su principal inconveniente (Donaldson, et al., 1972). Otro método para inducir a la maduración y puesta es el empleo de antagonistas dopaminérgicos, tales como la domperidona (Omeljaniuk et al., 1989; Peter et al., 1988; Lin y Peter, 1990), pimozida (Gissis et al., 1988; Lin et al., 1988; Chang et al., 1984b; Sokolowska et al., 1985a, 1985b; Billard et al., 1983), espiperona (Lin y Peter, 1990) y reserpina (Sokolowska et al., 1988). Con relación a este último aunque se ha descrito su influencia sobre el sistema neuroendócrino hipotalámico, no se conoce con exactitud la acción que puede tener a nivel hipofisario, por lo cual el presente trabajo contribuye al conocimiento de los efectos que provoca este fármaco en la hipófisis.

## **OBJETIVO GENERAL**

Valorar histológicamente el efecto de la reserpina sobre las células gonadotropas de la carpa común (Cyprinus carpio)

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Valorar histológicamente si en las células gonadotropas existe alguna variación apreciable en número, o volumen después de aplicar reserpina.
- Estudiar si hay una relación dosis-respuesta entre los cambios histológicos hipofisarios y a las distintas dosis de reserpina (0.5, 1 y 1.5 mg/Kg de peso)
- Correlacionar los cambios hipofisarios con cambios en actividad gonadotrópica evaluando en el testículo: índice gonadosomático y desarrollo gonadal.

## METODOLOGIA

Para la realización de este trabajo se utilizaron 30 machos de carpa común (Cyprinus carpio) de aproximadamente  $190 \pm 20$  g de peso, los cuales fueron sometidos a dos semanas de aclimatación con condiciones controladas, en donde la temperatura se mantuvo constante a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , el fotoperiodo tuvo un régimen de 12 h de luz (8:00 - 20:00) y 12 h de oscuridad (20:00 - 08:00). Las carpas fueron alimentadas ad libitum con alimento comercial balanceado Purina y se mantuvieron con aireación constante. Estas condiciones fueron mantenidas durante todo el experimento.

Al inicio del experimento fueron tomados 5 organismos al azar para formar el Grupo 1 (**Control inicial**), los cuales se sacrificaron al iniciar el experimento con el objeto de evaluar la condición inicial de la hipófisis y su estado gonadal antes del tratamiento, así como para evaluar el índice gonadosomático. Los 25 organismos restantes fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos de 5 organismos cada uno.

Grupo 2 (**control**), los cuales no recibieron tratamiento alguno, sólo fueron sometidos a las mismas condiciones de aclimatación y manipulación de los demás grupos.

Grupo 3 (**testigo**), a estos peces se les aplicaron 8 inyecciones de vehículo, una cada 48 hrs.

La reserpina (Sigma Chem 58F-0346) fue preparada en tres diferentes concentraciones: 0.5, 1 y 1.5 mg/ml de vehículo (propilenglicol y dimetilsulfóxido (9:1)) e inyectada intraperitonealmente, con la ayuda de una jeringa insulínica, con aguja No. 26.

Los Grupos 4 (**experimental 1**), 5 (**experimental 2**) y 6 (**experimental 3**), fueron tratados con diferentes dosis de reserpina (0.5, 1 y 1.5 mg/Kg de peso respectivamente), para cada caso se aplicaron 8 inyecciones de reserpina en las dosis correspondientes cada 48 hrs, durante 3 semanas comprendidas en el mes de febrero. En la Fig. 4 se resume la metodología empleada para los distintos grupos de trabajo.

Todos los organismos fueron sacrificados 48 h después de la última inyección, se pesaron e inmediatamente se decapitaron; se les extrajeron las gónadas cuidadosamente, las cuales fueron pesadas en una balanza granataria para obtener el índice gonadosomático (I.G.S.), así mismo se evaluó el grado de desarrollo gonádico, utilizando la escala de Nikolsky, 1963. (anexo No. 1).

Las gónadas fueron fijadas en formol neutro durante 72 h, lavadas en agua corriente y deshidratadas en alcoholes graduales para finalmente incluirlas en parafina (Paramex. Lab. "Del Río" S. A.). Se realizaron cortes transversales de 3  $\mu$ m de grosor, no seriados, con la ayuda de un microtomo rotatorio tipo Minnot (American Optical), los cuales fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina (HyE) (Luna, 1968).

Los cortes histológicos fueron examinados en un microscopio Carl Zeiss bifocal compuesto. La evaluación del grado de desarrollo gonádico fue basada en el tipo celular predominante.

Las hipófisis al igual que las gónadas fueron removidas inmediatamente y fijadas en formol sublimado (cloruro de mercurio 5.43 g; formaldehído 40% 10 ml; agua destilada 90 ml). Después de 24 h se lavaron en agua corriente durante 2 h.

Posteriormente las hipófisis fueron descalcificadas 5 h en una solución de EDTA al 0.1 M, lavadas con agua destilada y deshidratadas en alcoholes graduales para que finalmente fueran incluidas en parafina (Paramex. Lab. "Del Río" S. A.). Se realizaron cortes sagitales seriados de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de grosor, con la ayuda de un microtomo rotatorio tipo Minnot American Optical.

Los cortes fueron teñidos con la técnica de tinción combinada de pituitaria de pez, (Jafri, S. I., 1979) (anexo No. 2). Los conteos de las células gonadotropas fueron realizados en un microscopio Carl Zeiss bifocal compuesto, tomando en cuenta toda la serie de cortes de la hipófisis. Tomando en cuenta el tamaño de las células de aproximadamente  $25 \pm 5 \mu\text{m}$ , el conteo celular se realizó cada 5 cortes, con el propósito de que las células que se contaran no fueran las mismas. Los resultados del conteo se expresó de la siguiente forma, número aproximado de células gonadotropas por hipófisis.

En los cortes histológicos es difícil observar el núcleo de las células gonadotropas, ésto puede deberse a la ubicación de estas células en el corte y a la gran cantidad de gránulos que contienen, lo cual no permite que el núcleo sea visible. Debido a lo anterior el índice núcleo citoplasma no refleja una buena medida

del tamaño celular, por lo que se decidió obtener el volumen de las células gonadotropas de la siguiente forma:

La evaluación del volumen celular, se llevo a cabo con la ayuda de un ocular micrométrico American Optical de 8x calibrado con una reglilla objetivo de 2 mm American Optical, montado en un microscopio Reichert Nr 353 552. Las mediciones de las células gonadotropas se llevaron a cabo con un objetivo 100x registrando el ancho y largo de las células. Debido a que la mayoría de las células presentaban formas elipsoides o esféricas, se obtuvo el volumen celular a partir de las siguientes ecuaciones  $\pi(1/2 a + b)$  (elipse) y  $4/3 \pi r^3$  (esfera). La evaluación se llevó a cabo en 20 células por corte elegidas al azar, utilizando 3 cortes por organismo. Posteriormente se obtuvo el promedio del volumen celular por grupo.

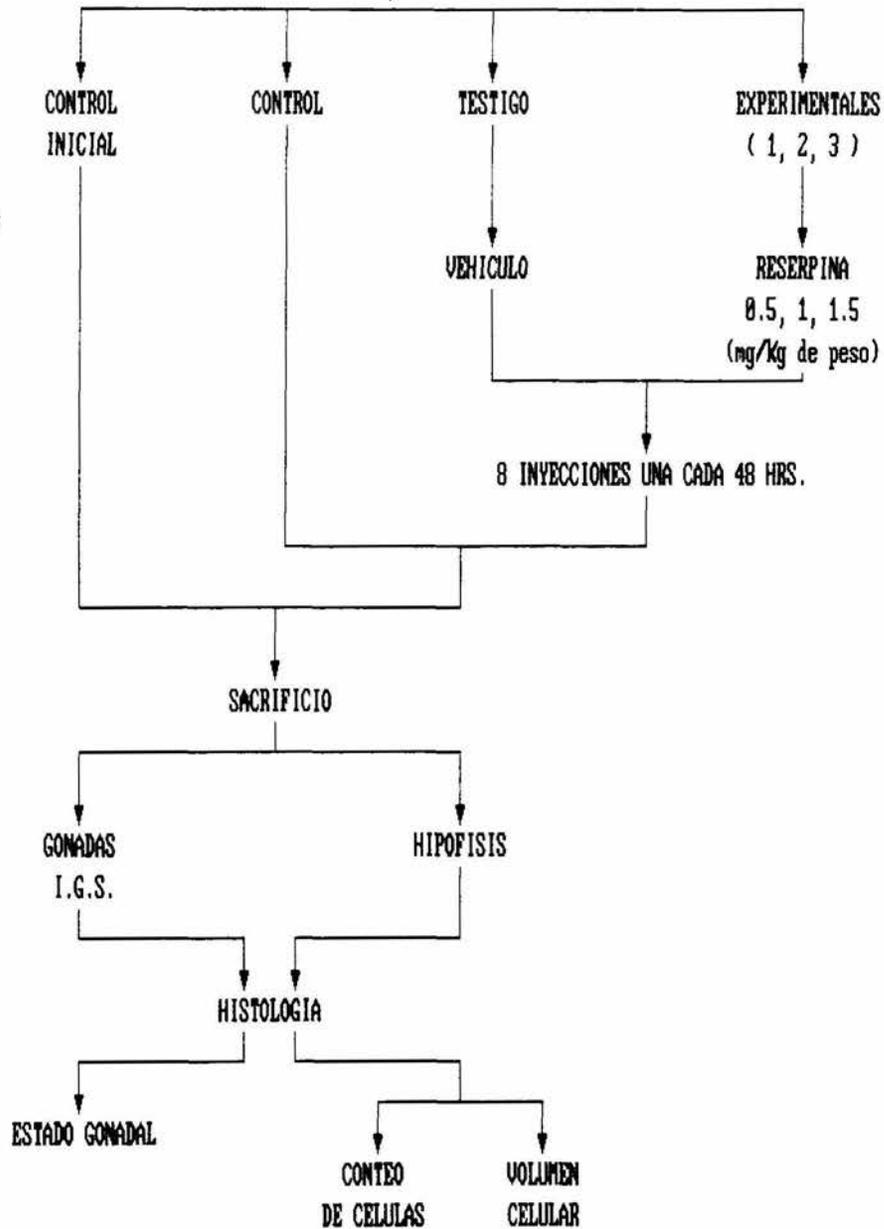
Los resultados fueron analizados estadísticamente por medio de la prueba de Kruskall Wallis ( $p < 0.05$ ), con el fin de establecer si había diferencias entre los tratamientos y la prueba U de Mann Whitney ( $p < 0.05$ ) (Siegel S., 1978) para comparar los grupos experimentales con los grupos control y testigo.

De los resultados de los I.G.S, número de células gonadotropas y volumen celular, se obtuvieron los porcentajes de los valores promedio de cada grupo, tomando los grupos controles como el 100% para cada caso.

Posteriormente se realizó la impresión fotográfica de los cortes de las gónadas y de células gonadotropas de los cortes de hipófisis en un fotomicroscopio marca Nikon mod. Labophot-2.

# METODOLOGIA

Carpa común (*Cyprinus carpio*)



**FIGURA 4.** Esquema metodológico que muestra las diferentes actividades realizadas durante el trabajo experimental.

## RESULTADOS

En las observaciones de hipófisis se puede apreciar que la mayoría de las células gonadotropas de todos los grupos se encuentran localizadas en la pars distalis y en forma escasa en la pars intermedia de la adenohipófisis,.

Las observaciones microscópicas de la hipófisis de los grupos control inicial, control y testigo muestran una gran cantidad de células tirotropas y corticotropas, mientras que las células gonadotropas están presentes en forma escasa (Figs. 5 y 6); en el caso del grupo experimental 3 (1.5 mg de reserpina/Kg de peso) se puede observar que presenta un ligero incremento de células gonadotropas (Fig. 7). Por otra parte, en los grupos experimental 1 (0.5 mg de reserpina/Kg de peso) y experimental 2 (1 mg de reserpina/Kg de peso) se pudo notar la presencia de una mayor cantidad de células gonadotropas (Figs. 8 y 9 respectivamente).

En los conteos de las células gonadotropas se puede apreciar que los grupos experimentales presentan un aumento considerable de células (Tabla No. 1), con respecto a los grupos control y testigo. Estadísticamente se pudo confirmar que existen diferencias significativas por las pruebas de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney,  $p < 0.05$  entre el número de células gonadotropas de los grupos experimentales 2 (2,506), 1 (1,361), 3 (610), comparados con el grupo control (355). Por otra parte al comparar los resultados de los experimentales 1, 2 y 3 con el grupo testigo (417) se observa que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con el grupo experimental 3.

Al presentar estos datos en términos de porcentajes considerando la media del grupo control como el 100% se puede observar que los grupos experimentales 2 y 1 presentan un aumento del 704.99% y 382.91% respectivamente, mientras que el grupo experimental 3 (171.64%) se encuentra con valores similares a los del grupo control inicial (61.74%), control (100%) y testigo (117.46%) (Fig. 10).

Los resultados anteriores nos indican que la reserpina ejerce un cierto efecto sobre las células gonadotropas aumentando su número, pudiendo observar que la dosis que actúa de una manera más efectiva es la de 1 mg de reserpina/Kg, la segunda fue la de 0.5 mg de reserpina/Kg de peso y por último la de 1.5 mg de reserpina/Kg de peso.

En las observaciones de la hipófisis se pudo apreciar que las células gonadotropas de los organismos experimentales, tratados con reserpina en sus diferentes dosis eran ligeramente más grandes, en comparación con las células de los organismos del grupo control y del testigo.

Los resultados de la evaluación del volumen de las células gonadotropas nos indican que los grupos experimentales 1 (246.94) y 2 (304.93) presentan un aumento considerable de éste (Tabla No. 1). Estadísticamente el volumen de las células del grupo experimental 3 (214.30) comparados con los del grupo control (220.57) y testigo (189.34) no presentan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Por otra parte al comparar los grupos experimentales 1 y 2 con los grupos control y testigo si existen diferencias significativas (Kruskall Wallis y U de Mann Whitney,  $p < 0.05$ ).

Al presentar estos datos en términos de porcentajes considerando la media del grupo control como el 100%, se observa que existe un aumento en el volumen de las células gonadotropas de los grupos experimentales 1 (123.11%), 2 (152.03%) y 3 (106.84%); registrando los valores más bajos los grupos control inicial (101.67%), control (100%) y testigo (94.40%). El grupo experimental 2 presentó un incremento del 52% con respecto del grupo control, mientras que el experimental 1 tuvo un ascenso de 23.11% (Fig. 11).

Estos resultados nos muestran que la reserpina provoca un aumento sobre el volumen de las células gonadotropas y que al igual que en el número de las mismas, la dosis que produce un mayor efecto es la de 1 mg/Kg y posteriormente la de 0.5 mg/Kg.

Los resultados de la evaluación del desarrollo gonadal, según la escala de Nikolsky, nos indican que todos los organismos empleados en el experimento se encontraban entre los estados IV y V (maduro y reproducción).

Las observaciones de las gónadas muestran que en los grupos control inicial, control y testigo se encontraron diferentes categorías celulares que van desde espermatoцитos primarios, secundarios, espermátides hasta espermatozoides (Figs. 12 y 13). A diferencia de los grupos experimentales 1, 2 y 3, en los cuales sólo se encontró una gran cantidad de espermatozoides (Figs. 14 y 15).

Por lo que respecta a los resultados de los índices gonadosomáticos se observa que no presentan grandes diferencias entre sí (Tabla No. 2). El grupo experimental 2 presenta un pequeño aumento con respecto al grupo control, aunque se comprobó que estadísticamente no existen diferencias significativas (Kruskall

**TABLA No. 1**  
**EFEECTO DE LA RESERPINA SOBRE LAS CELULAS**  
**GONADOTROPAS DE CARPA COMUN**  
**(*Cyprinus carpio*)**

**NUMERO DE LAS CELULAS GONADOTROPAS**

<b>GRUPOS</b>	<b>MEDIA</b>	<b>±</b>	<b>D.E.</b>
CONTROL INICIAL	219.50	±	12.25
CONTROL	355.50	±	225.50
TESTIGO	417.60	±	147.07
EXPERIMENTAL 1	1,361.25	±	438.85 * Δ
EXPERIMENTAL 2	2,506.25	±	939.71 * Δ
EXPERIMENTAL 3	610.20	±	340.31 *

**VOLUMEN DE LAS CELULAS GONADOTROPAS**

<b>GRUPOS</b>	<b>MEDIA</b>	<b>±</b>	<b>D.E.</b>
CONTROL INICIAL	203.93	±	7.49
CONTROL	220.57	±	9.32
TESTIGO	189.34	±	32.03
EXPERIMENTAL 1	246.94	±	36.81 * Δ
EXPERIMENTAL 2	304.93	±	53.05 * Δ
EXPERIMENTAL 3	214.30	±	42.23

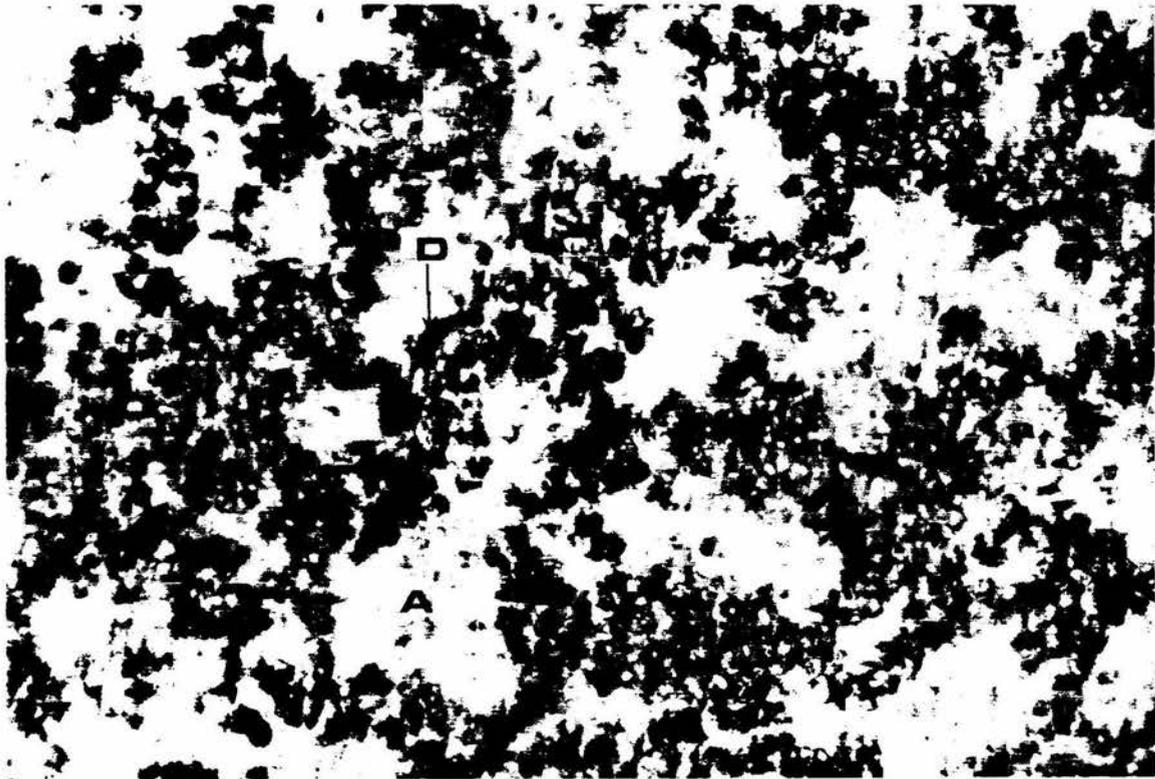
Media de los valores obtenidos por grupo del número de células gonadotropas y de su volumen. (desviación estandar (D.E.); número de organismos por grupo (5)). Los experimentales 1, 2 y 3 fueron tratados con reserpina (0.5, 1 y 1.5 mg/kg de peso respectivamente). \*Grupos que presentan diferencias significativas, con respecto al grupo control. Δ Grupos que presentan diferencias significativas, con respecto al grupo testigo (Kruskall Wallis y U de Mann Whitney,  $p < 0.05$ ).

**TABLA No. 2**

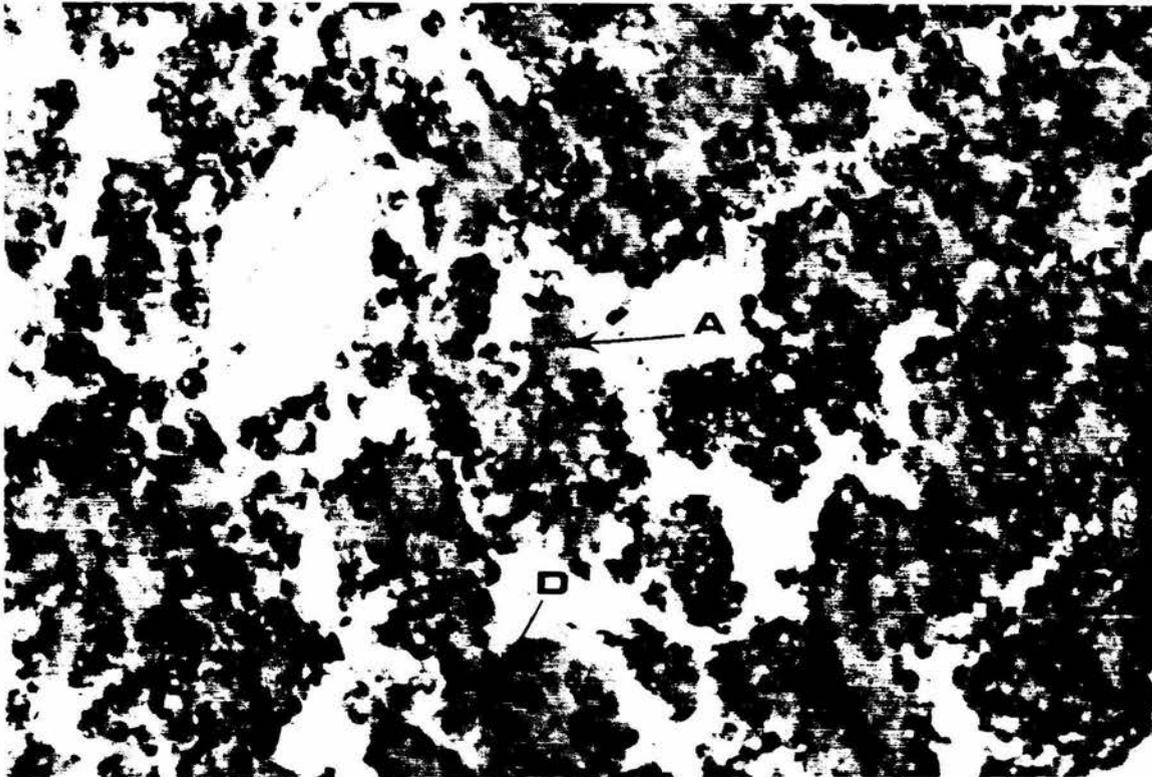
**EFFECTO DE LA RESERPINA SOBRE LOS I.G.S.  
DE LA CARPA COMUN (*Cyprinus carpio*)**

<b>GRUPOS</b>	<b>MEDIA</b>	<b>±</b>	<b>D.E.</b>
CONTROL INICIAL	4.17	±	0.36
CONTROL	4.90	±	0.64
TESTIGO	4.96	±	1.03
EXPERIMENTAL 1	4.94	±	0.70
EXPERIMENTAL 2	5.17	±	1.65
EXPERIMENTAL 3	4.90	±	0.75

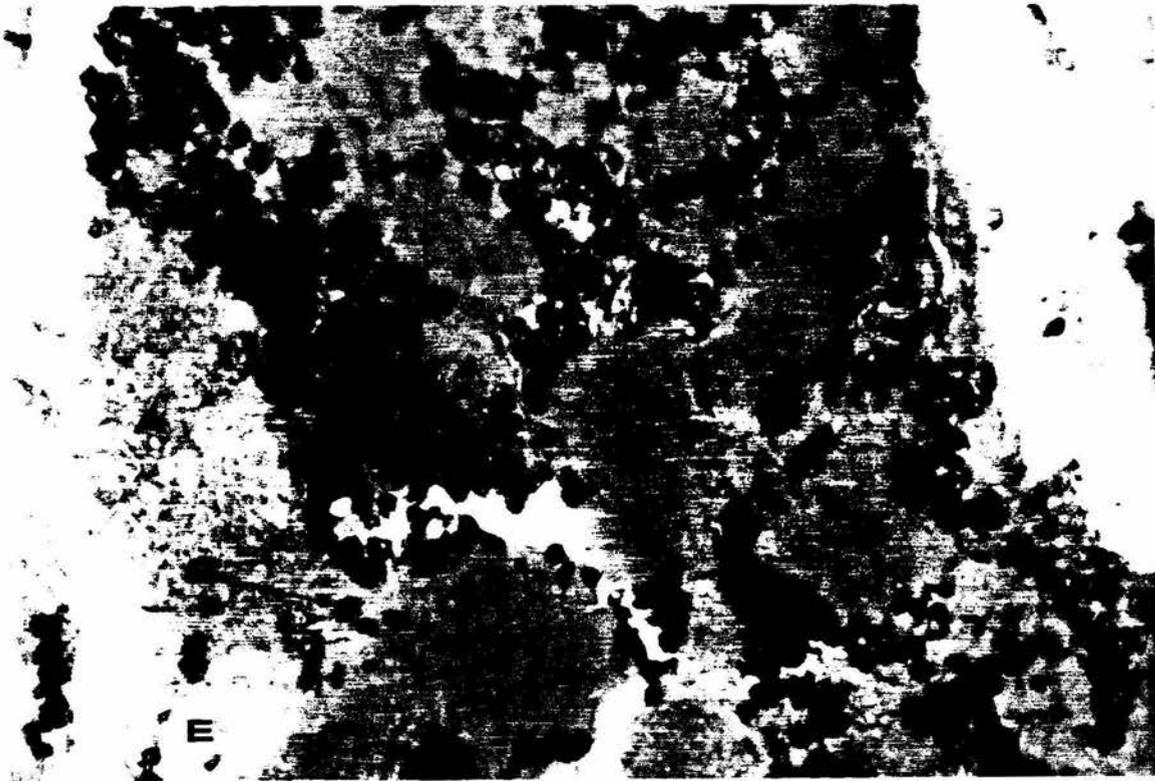
Media de los I.G.S. obtenidos por grupo (desviación estandar (D.E.); número de organismos por grupo (5)) . Los experimentales 1, 2 y 3 fueron tratados con reserpina (0.5, 1 y 1.5 mg/kg de peso respectivamente). Los grupos no presentan diferencias significativas (Kruskall Wallis,  $p > 0.05$ )



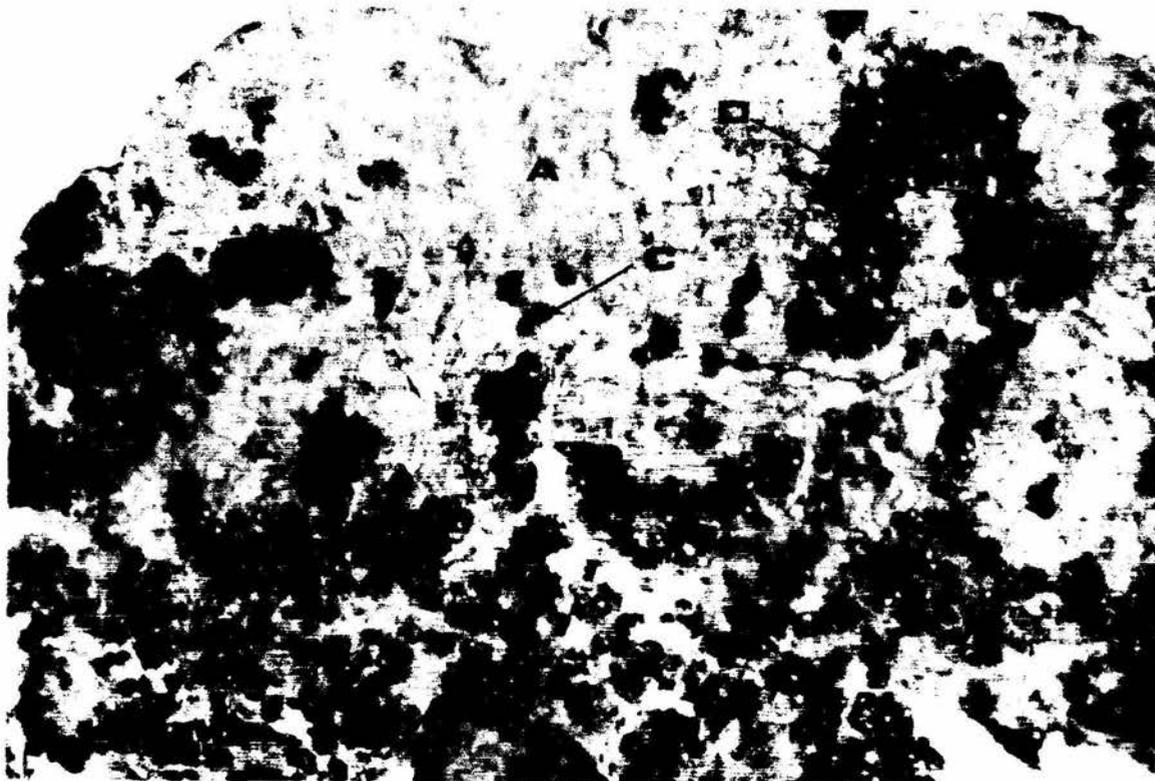
**FIGURA 5.** Sección sagital de hipófisis de *Cyprinus carpio* del grupo control, donde se observan células corticotropas (A) y células tirotropas (D). Tinción para Pituitaria de pez. ( x 300).



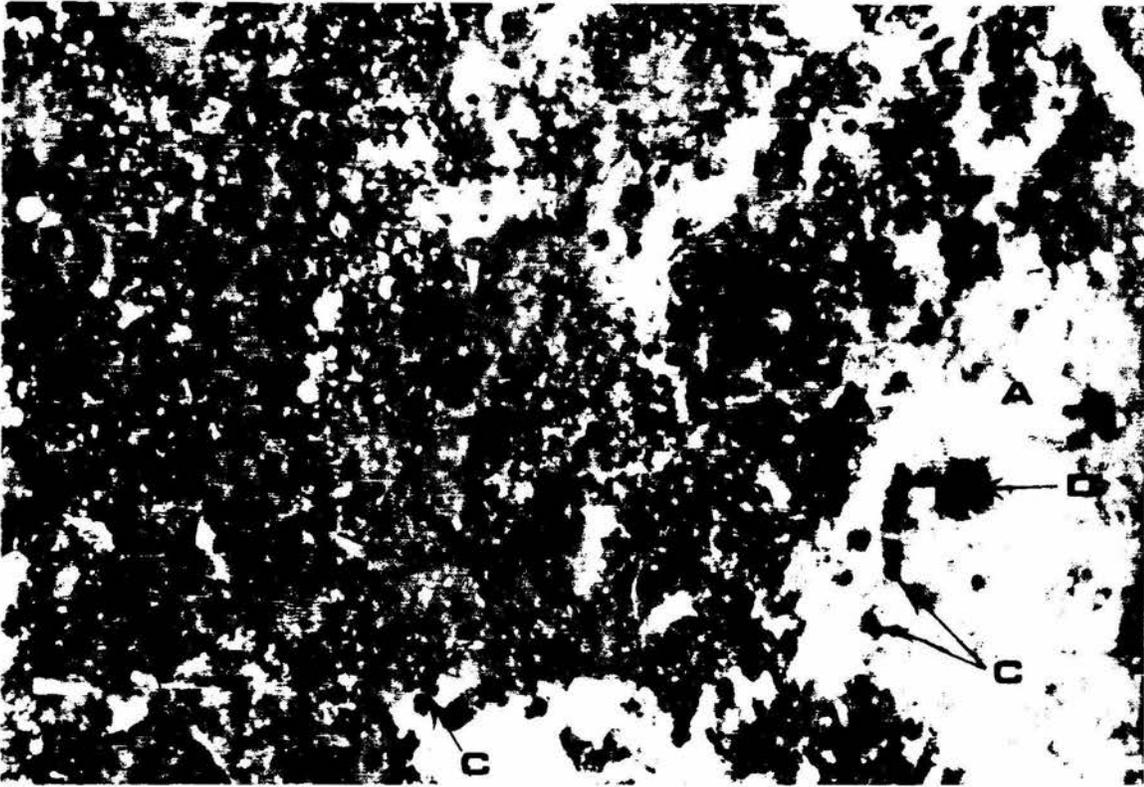
**FIGURA 6.** Sección de corte sagital de hipófisis de *C. carpio*. grupo **testigo**. Se aprecian células corticotropas (A) y células tirotropas (D).Tinción para Pituitaria de pez. (x 300) .



**FIGURA 7.** Sección de un corte sagital de hipófisis del grupo **experimental 3**, se aprecian diferentes tipos celulares. A: células corticotropas, B: células melanotropas, C: células gonadotropas, D: células tirotropas y E: fibras de la pars intermedia. Tinción para pituitaria de pez. (x 300).

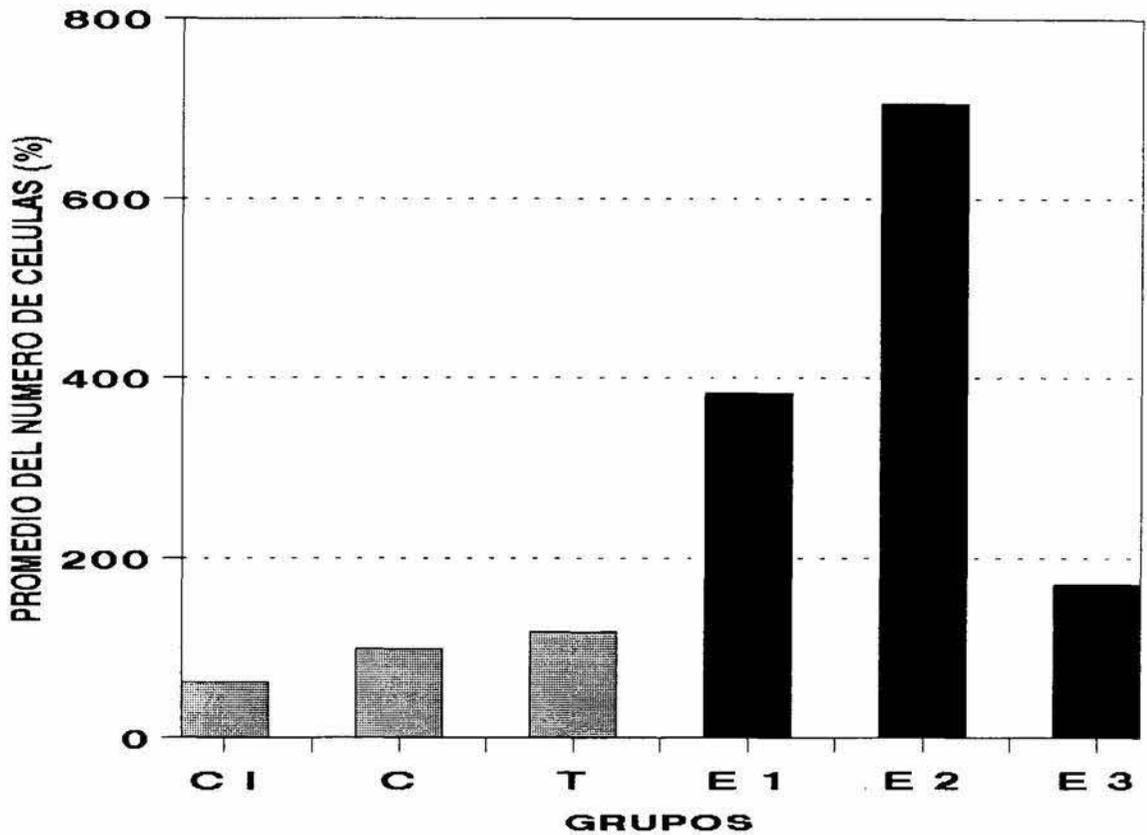


**FIGURA 8.** Sección sagital de hipófisis de C. carpio del grupo **experimental 1**. Se observan diferentes tipos celulares. A: células corticotropas, C: células gonadotropas, D: células tirotropas. Tinción para pituitaria de pez. (x 300).



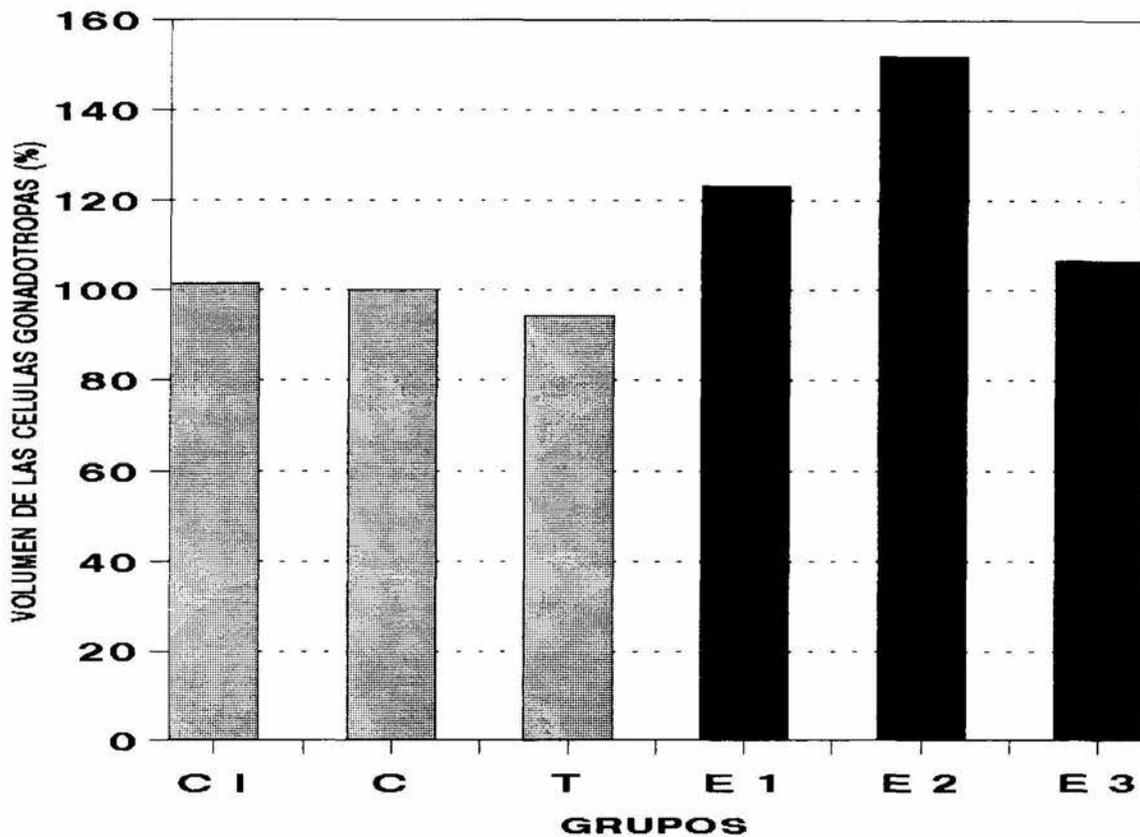
**FIGURA 9.** Corte sagital de hipófisis del grupo **experimental 2** con células corticotropas(A), células melanotropas (B), nótese el aumento en el número de células gonadotropas (C) y células tirotropas (D). Tinción para pituitaria de pez. (x 300).

**FIGURA 10**  
**EFFECTO DE LA RESERPINA SOBRE EL**  
**NUMERO DE CELULAS GONADOTROPAS**  
**DE CARPA COMUN (Cyprinus carpio)**

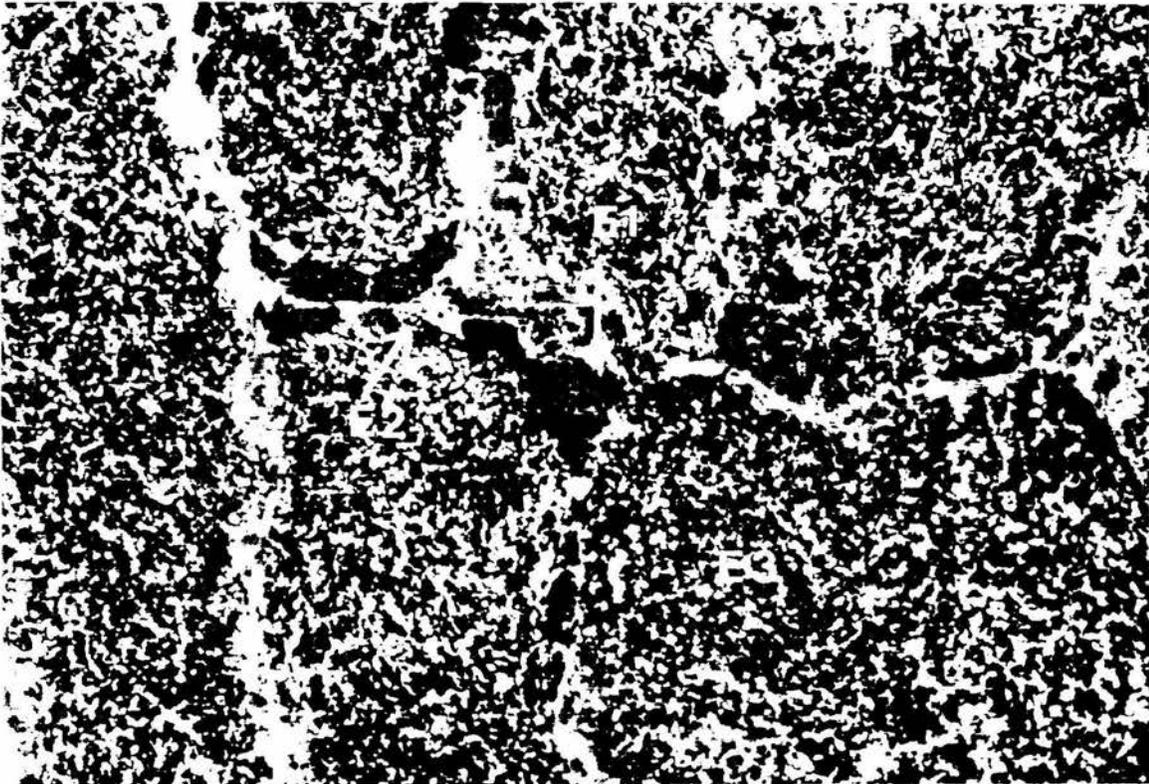


Valores promedio del número de células gonadotropas representados en porcentajes, tomando la media del grupo control como el 100%. Los experimentales E1, E2 y E3 fueron tratados con reserpina (0.5, 1 y 1.5 mg/kg de peso respectivamente)

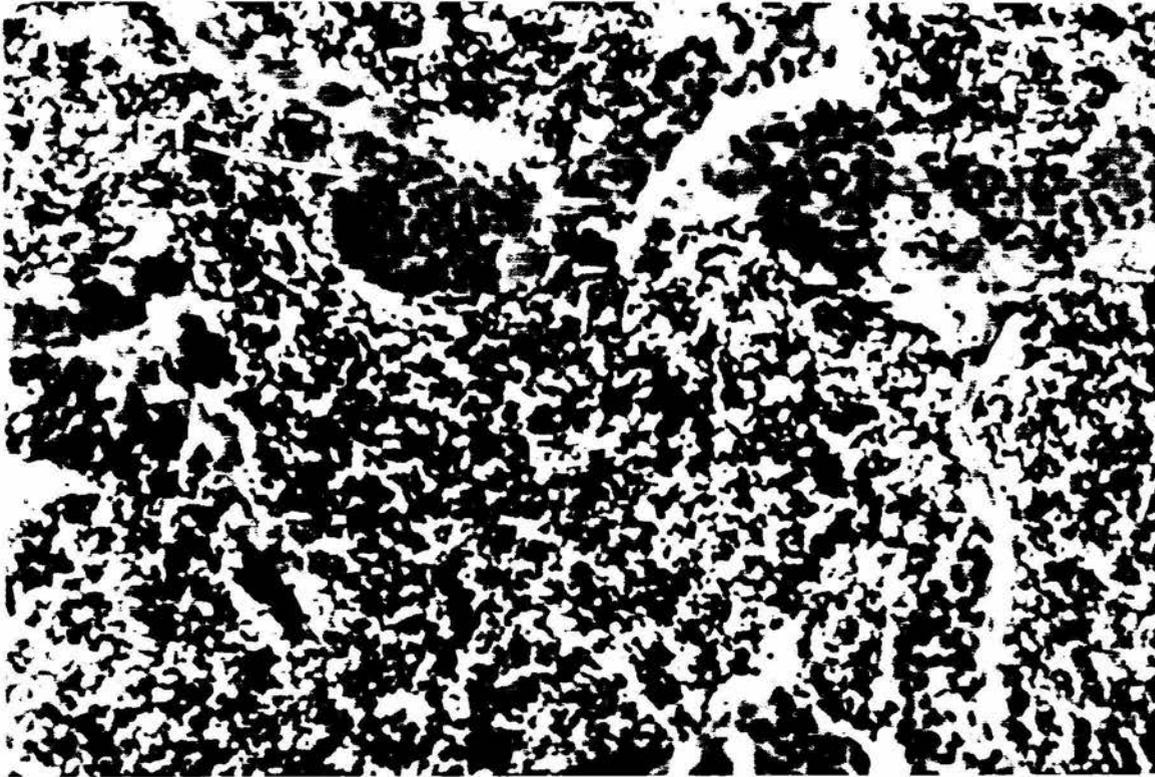
**FIGURA 11**  
**EFFECTO DE LA RESERPINA SOBRE EL**  
**VOLUMEN DE LAS CELULAS GONADOTROPAS**  
**DE CARPA COMUN (Cyprinus carpio)**



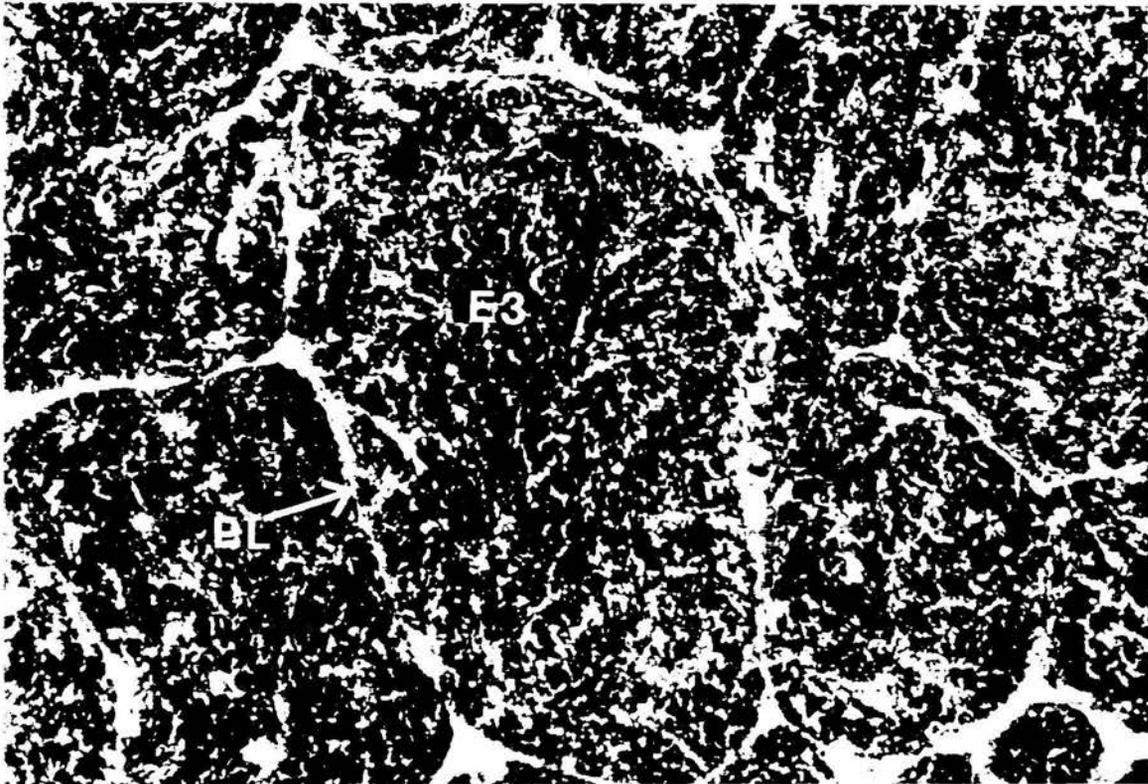
Valores promedio del volumen de las células gonadotropas representados en porcentajes, tomando la media del grupo control como el 100%. Los experimentales E1, E2 y E3 fueron tratados con reserpina (0.5, 1 y 1.5 mg/kg de peso respectivamente)



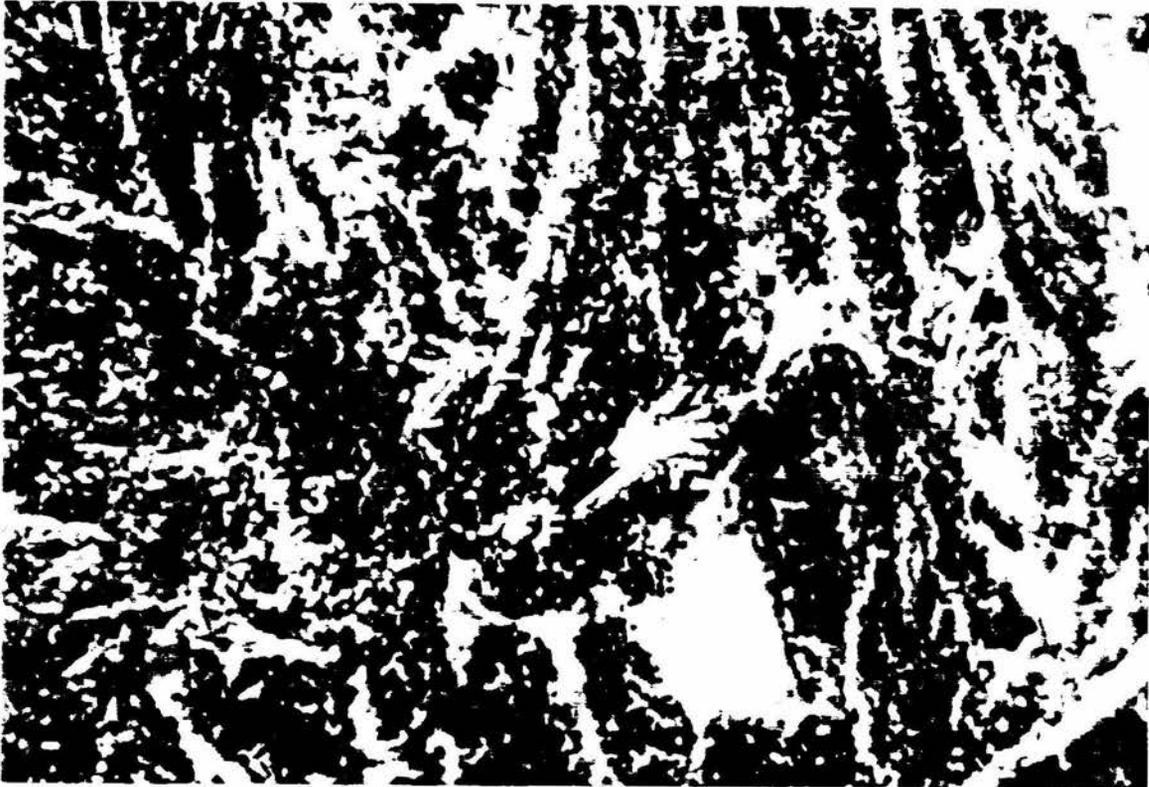
**FIGURA 12.** Sección transversal del testículo de *C. carpio* del grupo control. Se observan diferentes categorías celulares. E1:espermaticitos primarios, E2: probablemente espermaticitos secundarios o espermátides y E3: espermatozoides. Técnica de Hematoxilina y Eosina. (x 300).



**FIGURA 13.** Corte transversal de testículo del grupo **control**. Se aprecian espermatoцитos primarios (E1) y espermatozoides (E3). Técnica H y E. (x 600).

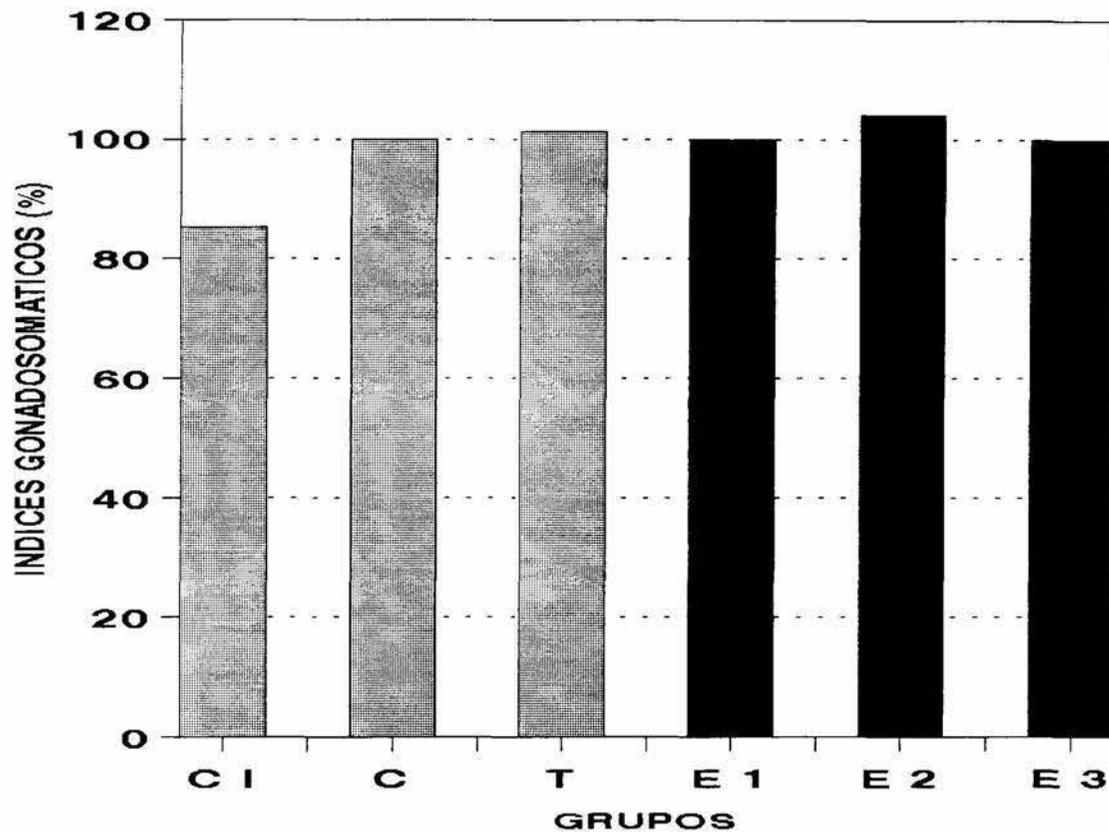


**FIGURA 14.** Testículo del grupo **experimental 2**, donde se observa la pared lobular (PL), gran cantidad de espermatozoides (E3) y tejido intersticial (Ti). Técnica de Hematoxilina y Eosina. (x 300)



**FIGURA 15.** Sección transversal de testículo de *C. carpio* del grupo experimental 2, se aprecia la pared lobular (PL), la presencia de espermatozoides (E3) y los flagelos de los espermatozoides (F). (x 600).

**FIGURA 16**  
**EFFECTO DE LA RESERPINA SOBRE LOS IGS**  
**DE CARPA COMUN (Cyprinus carpio)**



Valores promedio representados en porcentajes tomando la media del grupo control como el 100%. Los experimentales E1, E2 y E3 fueron tratados con reserpina (0.5, 1 y 1.5 mg/kg de peso respectivamente)

Wallis,  $p > 0.05$ ). Al presentar estos datos en términos de porcentajes se observa que no hay gran diferencia entre ellos (Fig. 16).

## DISCUSION

Estudios con fármacos antidopaminérgicos han demostrado ser efectivos para estimular la maduración y la puesta en diversas especies de teleósteos. Tal es el caso de la reserpina, fármaco que depleta la dopamina, la cual fue usada en el presente trabajo para valorar histológicamente su efecto sobre las células gonadotropas de la carpa común Cyprinus carpio.

Los resultados de las observaciones microscópicas de la hipófisis de la carpa común (Cyprinus carpio) nos indican que la técnica de tinción empleada sólo permite diferenciar entre la adenohipófisis (pars distalis, pars intermedia) y la neurohipófisis (Fig. 17) no se puede dar la ubicación exacta de las células gonadotropas (pars distalis proximal o rostral), lo que se puede observar es que la mayoría de estas células están localizadas en la adenohipófisis en la pars distalis y de forma escasa en la pars intermedia, como lo demostró Peter et al., (1990), pero por estudios como los realizados por Val-Sella et al., (1977) en la carpa común Cyprinus carpio podríamos suponer que presentaron una ubicación en la pars distalis proximal.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo: número de células gonadotropas, volumen celular e índices gonadosomáticos no cumplen con las características de normalidad, homogeneidad de varianzas, independencia y linealidad para realizar una prueba paramétrica, por lo cual se procedió a utilizar las pruebas estadísticas no paramétricas de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney, tal y



**FIGURA 17.** Fotografía panorámica de corte sagital de hipófisis de *Cyprinus carpio* del grupo **experimental 2**, en donde se observan las regiones de la adenohipófisis (pars distalis (PD) y pars intermedia (PI)). Tinción para pituitaria de pez.

como lo han realizado Chang et al., (1983 y 1984a), Sokolowska et al., (1988), entre otros.

El aumento en el número de células gonadotropas en los grupos experimentales tratados con reserpina puede explicarse quizá, a que como un mayor número de éstas se encuentra liberada de los efectos de la dopamina, en consecuencia puedan sintetizar más GtH (Sokolowska et al., 1988; Chang et al., 1993), acumularla temporalmente en su citoplasma y ésto facilite la identificación de un mayor número de células gonadotropas. En base a los datos disponibles en la literatura parece poco probable que la reserpina pueda inducir directamente la mitosis de dichas células.

Sin embargo, la reserpina de manera indirecta podría ocasionar un aumento en el número de las células gonadotropas, ya que al aumentar los niveles de GtH en plasma (Sokolowska et al., 1988) y estimular de esta forma la producción de esteroides sexuales, éstos, específicamente el estradiol (E2) podría actuar directamente sobre las células gonadotropas ejerciendo un efecto positivo sobre su desarrollo, tal vez induciendo mitosis, como lo que se ha observado en la hipófisis de las anguilas, en donde el estradiol (E2) ocasiona un aumento marcado en el número y en el tamaño de las células gonadotropas (Olivereau, M. y Olivereau, J., 1979).

El aumento en el volumen de las células gonadotropas de los grupos experimentales puede deberse a que la reserpina ocasiona que dichas células que se encuentran libres de la acción de la dopamina sean más activas, ya que de acuerdo con los estudios realizados en pez dorado Carassius auratus se ha demostrado que al aplicar reserpina se elevan los niveles de GtH y aumenta la actividad de las células

gonadotropas (Chang et al., 1983). Por otra parte, el incremento en los niveles de GtH, pueden provocar aumento en los esteroides sexuales, los cuales han demostrado que en la carpa común ejercen un efecto de retroalimentación positiva sobre las células gonadotropas, provocando que estas células presenten una mayor actividad y secreción de GtH ( Trudeau, et al., 1991).

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

En base a los resultados obtenidos podemos decir que si hay una relación entre los cambios hipofisarios y las diferentes dosis de reserpina (0.5, 1 y 1.5 mg/Kg de peso); las concentraciones de 0.5 y 1 son las que tuvieron mejores resultados al aumentar el número de células gonadotropas y el volumen celular, mientras que la dosis más alta (1.5) presenta valores parecidos a los controles. Todo parece indicar que a ésta concentración el sistema ha llegado a su capacidad límite, por lo que a concentraciones mayores de reserpina el sistema se muestra indiferente, con lo cual se corrobora que la dosis adecuada de reserpina es de 1 mg/Kg de peso como lo informó Sokolowska et al., (1988)

Los índices gonadosomáticos nos muestran que no hay diferencias entre los diferentes grupos. El I.G.S. no es un parámetro muy confiable para determinar el desarrollo de la gónada por lo que De Vlaming (1982), recomienda que el I.G.S. sea corroborado con imágenes de cortes histológicos, los cuales nos ayudan a discernir sobre la madurez gonadal de los organismos.

Las imágenes al microscopio de las gónadas de los grupos experimentales presentan más espermatozoides y no se aprecian estadios tempranos de la espermatogénesis (espermatoцитos primarios, secundarios), como ocurre en el grupo control y testigo, con lo anterior podemos decir que la reserpina favorece la espermatogénesis.

Como demostró Sokolowska (1988), la reserpina favorece la espermatogénesis con una dosis de 1 mg/Kg de peso en carpas maduras, ya que registró un aumento en los niveles de GtH sérica y en los volúmenes de esperma hasta 48 horas después de la inyección. En otros estudios realizados en carpas juveniles Cyprinus carpio de menor tamaño (aproximadamente 100 g) se ha demostrado que la dosis de 1 mg/Kg favorece la espermatogénesis temprana, aumentando de manera significativa la cantidad de espermatoцитos secundarios en el testículo (García, B. 1994).

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos por Sokolowska (1988) y García (1994), ya que al parecer la espermatogénesis también se vé favorecida en peces de 250 g inyectados 8 veces con dosis de reserpina de 0.5, 1 y 1.5 mg/Kg de peso, una cada 48 horas.

Se ha comprobado en el pez dorado Carassius auratus que al inhibir la síntesis de catecolaminas (dopamina, norepinefrina y epinefrina) por el bloqueo de la conversión de tirosina a L-Dopa provoca un incremento en los niveles de GnRH (Peter et al., 1990). Es posible que al eliminar a la dopamina del sistema encefálico por efecto de la reserpina, también se podrían aumentar los niveles de GnRH y de esta forma ocasionar un incremento en los niveles de GtH.

La manipulación de los peces durante el experimento sin la aplicación de un anestésico pudo ocasionarles estrés, provocando de esta manera la liberación de adrenalina y noradrenalina. Esta última, de estar presente en la hipófisis cerca de las células gonadotropas es capaz de inducir la liberación de GtH, pudiendo con ello favorecer un aumento en su volumen celular y provocar un pequeño incremento en la espermatogénesis (Peter et al., 1990). Esto probablemente ocurrió en los organismos experimentales y testigo, los cuales fueron manipulados bajo las mismas condiciones, pudiendo ocasionar que el estrés influyera en nuestros resultados. Si bien es posible observar un pequeño incremento no significativo en el número de células gonadotropas y en el volumen celular del grupo testigo respecto a los grupos experimentales, éstos últimos presentan un aumento considerablemente mayor, por lo que podemos afirmar que fue la reserpina la que lo provocó.

La reserpina al depletar a la dopamina del sistema hipofisiario provoca que los mecanismos intracelulares que se encuentran inhibidos (movilización del calcio intracelular, la acción de la proteína cinasa C y los componentes del AMPc) (Chang et al., 1993) se vuelven a activar, ocasionando un aumento de AMPc y de  $(Ca)_i$  en las células gonadotropas; las cuales, al encontrarse más activas van a sintetizar y liberar más GtH (Chang et al., 1983), lo que va a tener como consecuencia que exista una mayor actividad gonádica (Sokolowska et al., 1988).

## CONCLUSIONES

1. Al depletar la dopamina del sistema tanto hipotalámico, como hipofisiario, un mayor número de células gonadotropas puede sintetizar y liberar GtH.
2. La aplicación de reserpina en las dosis de 0.5 mg/Kg y 1 mg/Kg causan un aumento significativo en el volumen y en el número de las células gonadotropas de la hipófisis de carpa común Cyprinus carpio.
3. Existe una relación dosis-respuesta entre los cambios histológicos hipofisiarios (número de células gonadotropas, volumen celular) y distintas dosis de reserpina (0.5, 1 y 1.5 mg/Kg de peso), siendo la de 1 mg/Kg de peso la más efectiva.
4. El aumento en la secreción de GtH por acción de la reserpina, ocasiona que la actividad gonadal de carpa común Cyprinus carpio, sea favorecida en el testículo.

## A N E X O No. 1

### ESCALA DE DESARROLLO GONADICO

(Nikolsky G. V., 1963)

**ESTADO I.** Organismos juveniles, los cuales nunca han desovado.

**ESTADO II. INACTIVIDAD.** Los gametos aún no han sido liberados y empiezan su desarrollo; el proceso de engrosamiento de la cavidad de la gónada está completo; las gónadas son de tamaño muy pequeño; los huevos no son visibles.

**ESTADO III. MADURANDO.** Los huevos son visibles; la gónada incrementa de peso muy rápidamente; los testículos cambian de color, de transparentes a palo de rosa.

**ESTADO IV. MADURO.** Los gametos están maduros; las gónadas han alcanzado su peso máximo, pero los gametos aún no son liberados al aplicarle presión al tórax del pez.

**ESTADO V. REPRODUCCION.** Los gametos son liberados cuando se le aplica presión al pez en el tórax; el peso de la gónada disminuye rápidamente cuando el proceso de desove termina.

**ESTADO VI. CONSUMO.** Los gametos fueron expulsados, y la cavidad gonadal disminuyó su engrosamiento; la gónada tiene una apariencia de saco vacío, usualmente con pocos huevecillos en el caso de las hembras o de espermatozoides en los machos.

## A N E X O No. 2

### TINCION COMBINADA PARA PITUITARIA DE PEZ

(Jafri, S. I. H. 1979)

Fijar en formol sublimado (cloruro de mercurio 5.43 g; formaldehído al 40%, 10 ml; agua destilada, 90 ml) durante 24 h Descalcificar 5 h Después del procesamiento de deshidratación incluirlos en parafina y cortar en secciones de 5  $\mu\text{m}$ .

1. Desparafinar y llevar los cortes hasta agua.
2. Remover los precipitados de mercurio con tratamiento en lugol por 10 min. Después en tiosulfato de sodio al 5% por 5 min.
3. Inmersión de los cortes en ácido perfórmico (ácido fórmico 98% 45 ml.; peróxido de hidrógeno 30% 4.5 ml., ácido sulfúrico concentrado 0.5 ml) por 5 min.
4. Lavar en agua corriente 10 min.
5. Lavar en alcohol del 70% 1 min.
6. Lavar en alcohol 100% 3 min.
7. Lavar en agua corriente 5 min.
8. Teñir en azul alciano (azul alciano C.I. 74240, 3 grs; ácido sulfúrico 2N 100 ml. Disolver por calentamiento a 70° C, enfriar y filtrar pH 0.2 a 0.3) 45 min..
9. Lavar rápidamente en agua corriente.
10. Oxidar en ácido periódico al 0.5% durante 5 min.
11. Teñir en reactivo de Schiff 1 h (el reactivo de Schiff frío de Lillie y Fullmer 1976)
12. Lavar con agua corriente 3 min.
13. Lavar con agua destilada 1 min.

14. Teñir en naranja G-ácido fosfotúngstico (naranja G C.I. 16230, 2 g.; ácido fosfotúngstico 1 g, agua destilada 100 ml) 20 min.
15. Lavar en agua corriente.
16. Teñir en 1% de fucsina ácida (C. I. 42685) 10 min.
17. Lavar en agua corriente.
18. Deshidratar, aclarar y montar.

## **RESULTADOS**

Los 6 tipos celulares de la hipófisis responden a la combinación de los colorantes ácidos y básicos de la siguiente forma:

FUCSINA ACIDA:	LACTOTROPAS - Rojo CORTICOTROPAS - Rosa claro MELANOTROPAS - Rosa brillante
NARANJA G:	SOMATOTROPAS - Naranjas
PAS:	GONADOTROPAS - Rojo magenta
PAS + AB:	TIROTROPAS - Azul marino

El material neurosecretor en la pars nerviosa y fibras en la pars intermedia se tiñen de azul claro.

## REACTIVO DE SCHIFF

(Luna, L. G., 1968)

Fucsina básica 1g

Agua destilada 200 ml

HCl 1N 20 ml

Bisulfito de sodio 1g

Carbón activado

Disolver la fucsina básica en el agua destilada caliente, llevar a ebullición. Enfriar a 50°C. Filtrar y adicionar el HCl. Enfriar más y agregar el bisulfito de sodio y una pequeña cantidad de carbón activado. Guardar en la obscuridad y en refrigeración durante 48h hasta que la solución quede color paja.

## BIBLIOGRAFIA

Billard, R.; Breton, R. y Dubois, M. P. (1971). Immunocytologie et histochimie des cellules gonadotropes et thyroïdiques hypophysaires chez la carpe Cyprinus carpio. **C. R. Hebd. Seances. Acad. Sci., Ser. D.** **272**: 981-983.

Billard, R. y Peter, R. E. (1977). Gonadotropin release after implantation of anti-estrogen in the pituitary and hypothalamus of goldfish, Carassius auratus. **Gen. Comp. Endocrinol.** **32**: 213-220.

Billard, R.; Alagarwami, K. y Peter, R. E. (1983). Potentialisation par le pimozide des effets du LHRH-A sur la secretion gonadotrope hypophysaire, l'ovulation et la spermiation chez la Carpe commune (Cyprinus carpio) **C. R. Acad. Sci., Paris Ser. III** **296**: 181-184.

Bommelaer, M. C., Billard, R., y Breton, B. (1981). Changes in plasma gonadotropin after ovariectomy and estradiol supplementation at different stages at the end of the reproductive cycle in the rainbow trout (Salmo gairdneri R.) **Reprod. Nutr. Dev.** **21**: 989-997.

Cambre, M. L.; Verdonck, W.; Ollevier, F.; Vandersande, F. Batten, T. F. C. y Kuhn, E. R. (1986). Immunocytochemical identification and localization of the different cells types in the pituitary of the sea bass Dicentrarchus labrax. **Gen. Comp. Endocrinol.** **61**: 368-375.

Carrillo, M. (1977). Histofisiología de la glándula pituitaria de la chuclá Spicara chryselis. **Inv. Pesq.** **41(2)**: 385-440.

Crim, L. W. y Evans, D. M. (1979). Stimulation of pituitary gonadotropin by testosterone in juvenile rainbow trout (Salmo gairdneri). **Gen. Comp. Endocrinol.** **40**: 283-290.

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.; Cook, A. F. y Peter, R. E. (1983). Influences of catecholamines on gonadotropin secretion in goldfish Carassius auratus. **Gen. Comp. Endocrinol.** **49**: 22-31.

Chang, J. P.; Mackenzie, D. S.; Gould, D. R. y Peter, R. E. (1984a). 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.; Peter, R. E.; Nahorniak, C. S. y Sokolowska, M. (1984b). Effects of catecholaminergic agonists and antagonists on serum gonadotropin concentrations and ovulation in goldfish: Evidence for specificity of dopamine inhibition of gonadotropin secretion. **Gen. Comp. Endocrinol.** **55**: 351-360.

Chang, J. P.; Marchant, T. A.; Cook, A. F.; Nahorniak, C. S. y 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.; y De Leeuw, R. (1989). Participation of arachidonic acid metabolism in gonadotropin releasing hormone stimulation of goldfish gonadotropin release. **Gen. Comp. Endocrinol.** **76**: 2-11.

Chang, J. P.; Yu, K. L.; Wong, A. D. L. y Peter, R. E. (1990). Diferential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release in vitro in goldfish. **Neuroendocrinol.** **51**: 664-674.

Chang, J. P.; Wildman, B y Van Goor, F. (1991). Lack of involvement of arachidonic acid metabolism in chicken GnRH-II stimulation of gonadotropin secretion in dispersed pituitary cells of goldfish, Carassius auratus. Identification of a major difference in salmon GnRH and chicken GnRH-II mechanisms of action. **Mol. Cell. Endocrinol.** **79**: 75-83.

Chang, J. P.; Wong, A. O. L.; Van Der Kraak, G y Van Goor, F. (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. y Wong, A. O. L. (1993). Intracellular mechanisms mediating gonadotropin and growth hormone release in the goldfish Carassius auratus. **Fish Physiol. Biochem.** **11**: 25-33.

Danger, J. M., Breton, M., Vallariano, A., Fournier, G. Pelletier, G. y Vaudry, H. (1991). Neuropeptide- Y in the trout brain and pituitary: localization, characterization, and action on gonadotropin release. **Endocrinology** **128**: 2360-2368.

De Leuw, R.; Kamphius, W.; Goos, H. y Van Oordt,, P. (1984). Peptidergic and aminergic regulation of gonadotropin secretion by the pituitary of the afrecan catfish Clarias lazera. An "in vitro" study **Gen. Comp. Endocrinol.** **35**: 348-440.

Dobourg, P.; Burzawa-Gerard, E.; Chambolle, P. y Kah, O. (1985). Ligth and electron microscopic identification of gonadotropic cells in the pituitary gland of the goldfish by means of inmunocytochemistry. **Gen. Comp. Endocrinol.** **59**: 472-481.

Donaldson, E.M.; Yamazaki, F.; Dye, H. M. y Phylleo, W. W. (1972). Preparation of gonadotropin from salmon (Oncorhynchus tshawytscha) pituitary glands. **Gen. Comp. Endocrinol.** **18**; 469-481.

Douglas, F. P. (1991) *Histología Básica*. Edit. Manual Moderno, S. A. de C. V. México. pp. 410-419.

Drill, V. A. (1978) *Farmacología Médica*. Edit. La Prensa Mexicana. Ed. 2a. México, D. F. pp. 475-481.

Espinosa de los Monteros, J. y Labarata, U. (1986). *Reproducción en Acuicultura*. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. Madrid, España. pp. 5-28.

Eckert, R.; Randall, D. y Agustine, G. (1990). *Fisiología Animal. Mecanismos y Adaptaciones*. Edit. Interamericana McGraw-Hill. Ed. 3a. México, D. F. pp. 293-298.

García, B. M. R. (1994). Efecto de la reserpina en la espermatogénesis de carpa común (Cyprinus carpio). Tesis Profesional de Licenciatura. UNAM Campus Iztacala. Los Reyes Iztacala.

Gissis, A.; Levavi-Zermonsky, B.; Bogomolnaya Bass, A. y Yaron, Z. (1988). Gonadotropin levels in female tilapia treated with GnRH analog, and reserpine or pimozide. En: *Reproduction in Fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology*. (Y. Zohar and B. Breton eds.). INRA, Paris. pp. 63-67.

Habibi, H. R., De Leeuw, R. Nahorniak, C. S., Goos, H. J. T y Peter, R. E. (1989). Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish: seasonal and gonadal effects. **Fish Physiol. Biochem.** 7: 109-118.

Houssay, B. A. (1931). Action sexuelle de l'hypophyse sur les poissons et les reptiles. **C. R. Soc. Biol.** 106: 377-378.

Jafri, S. I. H. (1979). Combined stain for fish pituitary. **Stain Technol.** 54(2): 93-95.

Jobin, R. M. y Chang, J. P. (1992). Actions of two native GnRHs and PKC activators on goldfish pituitary cells. Studies on intracellular calcium levels and gonadotropin release. **Cell. Calcium** 13: 531-540.

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

Kah, O., Ponter, J. M., Danger, P., Dubourg, G. Pelletier, H., Vaudry y Calas, A. (1989). Characterization , cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. **Fish Physiol. Biochem** 7: 69-76.

Kah, O., Trudeau, V. L., Sloley, B. D., Martinoli, M. G., Chang, J. P., Yu, K. L., y Peter, R.E. (1991). Implication of GABA in the neuroendocrine regulation of gonadotrophin release in the goldfish (*Carassius auratus*). **Proceedings of the fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. (Norwich, U. K.):** 57-59.

Kobayashi, M., y Stacey, N. E. (1990). Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in females goldfish. **Zool. Sci. (Tokyo)** 7: 715-721.

Lagler, K. F.; Bardach, J. E.; Miller, R. R. y Passino, M. D. (1984). Ictiología. Edit. AGT Editor. Ed. 1a. en español. México, D. F. pp. 305-360.

Lin, H. R. y Peter, R. E. (1990). Induced breeding of cultured fish in China, En: Fish Physiology, Fish Toxicology, and Fisheries Management Proceedings of an International Symposium. (R. C. Ryans ed.) U. S. Environmental Protection Agency, Athens, Georgia. pp. 34-45.

Lin, H. R. Van Der Kraak, G.; Zhou, X. J.; Liang, J. Y.; Peter, R. E.; Rivier, J. E. y Vale, W. W. (1988). Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A) and [D-Ala6, Pro9NET]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. **Gen. Comp. Endocrinol.** **69**: 31-40.

Luna, L. G. (1968). Manual of histologic staining methods of the forces Institute of pathology. Ed. 3a. Edit. McGraw-Hill. Book Company., New York., pp. 258.

McKeown, B. A., y Van Overbeeke, A. P. (1971). Immunohistochemical identification of pituitary hormone producing cells in the sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. **Walbum. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, **112**: 350-362.

Nikolsky, G. V. (1963). The ecology of fishes. Edit. Academic Press Inc. (London). pp. 160.

Nozaki, M.; Naito, N.; Swanson, W.; Miyata, K.; Nakai, Y.; Oota, Y.; Suzuki, K. y Kawauchi, H. (1990 a). Salmonid Pituitary Gonadotrophs. I. Distinct Cellular Distributions of Two Gonadotropins, GtH I and GtH II. **Gen. Comp. Endocrinol.** **77**: 348-357.

Nozaki, M.; Naito, N.; Swanson, P.; Dickhoff, W.; Miyata, K.; Nakai, Y.; Suzuki, K. y Kawauchi, H. (1990 b). Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GtH I and GtH II cells in the rainbow trout. *Salmo gairdneri irrideus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** **77**: 358-367.

Omeljaniuk, R. J.; Shih, S. H. y Peter, R. E. (1987). *in vivo* evaluation of dopamine receptor-mediated inhibition of gonadotrophin secretion from the pituitary gland of the goldfish, *Carassius auratus*. **J. Endocrinol.** **114**: 449-458.

Omeljaniuk, R. J.; Tonon, M. C. y Peter, R. E. (1989). Dopamine Inhibition of Gonadotropin - Melanocyte - Stimulating Hormone Release *in vitro* from the Pituitary of the Goldfish. **Gen. Comp. Endocrinol.** **74**: 451-467.

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

Peter, R. E. (1983). The brain and neurohormones in teleost reproduction. En **Fish Physiology**. Vol: IX, parte A. Edit. Academic Press. New York. pp. 97-135.

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

Peter, R. E.; Omeljaniuk, R. J. y 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.; Kei-Li, Y. y Marchant, T. (1990). Direct Neural Regulation of the Teleost Adenohypophysis. **J. Exp. Zool. Suppl.** **4**: 84-89.

Peter, R. E., Trudeau, V. L. Sloley, B. D., Peng, C. y Nahorniak, C. S. (1991a). 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.): 30-34.

Peter, R. E., Trudeau, V. L. y Sloley, B. D. (1991b). Brain regulation of reproduction in teleosts. **Bull. Inst. Zool. Academia Sinica Monograph** **16**: 89-118.

Rodríguez, C. R. (1984). Vademécum académico de medicamentos. Facultad de Medicina de la UNAM, Tomo II. pp. 746-747.

Siegel, S. (1978). Estadística no paramétrica. Edit. Trillas. Ed. 4a. México, D. F. pp. 143-155.

Sloley, B. D.; Trudeau, V. L.; Dulka, J. G. y Peter, R. E. (1991). Selective depletion of dopamine in the goldfish pituitary caused by domperidone. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** **69**: 776-781.

Sokolowska, M.; Peter, R. E.; Nahorniak, C. S.; Pan, C. H.; Chang, J. P.; Crim, L. W. y Weil, C. (1985a). The effect of different doses of pimozide and (D-Ala 6, Pro 9-N ethylamide)-LHRH (LHRH-A) on gonadotropin release and ovulation in female goldfish. **Can. J. Zool.** **63**: 1252-1256.

Sokolowska, M.; Peter, R. E.; Nahorniak, C. S., y Chang, J. P. (1985b). Seasonal effects of pimozide and des Gly 10 (d-Ala 6) LH-RH ethylamide on gonadotropin secretion in goldfish. **Gen. Comp. Endocrinol.** **57**: 472-479.

Sokolowska, M.; Mikolajczyk, T.; Epler, P.; Peter, R.; Piotrowski, W. y Bleniarz, K. (1988). The effects of reserpine and LHRH or salmon GnRH analogues on gonadotropin release, ovulation and spermiation in common carp *Cyprinus carpio*. **Reprod. Nutr. Develop.** **28**: 889-897.

Somoza, G. M., Yu, K. L., y Peter, R. E. (1988). Serotonin stimulates gonadotropin release in female and male goldfish, *Carassius auratus*, L. **Gen. Comp. Endocrinol.** **72**: 364-382.

Somoza, G. M. y Peter, R. E. (1991). Effects of serotonin on gonadotropin and growth hormone release from *in vitro* perfused goldfish pituitary fragments. **Gen. Comp. Endocrinol.** **82**: 103-110.

Trudeau, V. L.; Lin, H. R. y Peter, R. E. (1991). Testosterona potentiates the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in the common carp (*Cyprinus carpio*) and Chinese loach (*Paramisgurnus dabryanus*). **Can. J. Zool.** **69**: 2480-2484.

Van Asselt, L. A. C.; Goos, H. J. Th; Smith Van Dijk W.; Speetjens P. A. M. y Van Oordt P. G. W. (1988). Evidence for the involvement of D2 receptors in the dopaminergic inhibition of gonadotropin release in the African catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture** **72**: 369-378.

Van Oordt, P. G. W. y Peute, J. (1983). The celular origin of the pituitary gonadotropins in teleosts. En **Fish Physiology**. Vol: IX. parte A. Edit. Academic Press. New York. pp. 137-186.

Val-Sella, M. V.; Guiffrida, R. y Sawaya, P. (1977). Morphology of the carp hypophysis (*Cyprinus carpio* L.). **Anat. Anz.** **142**: 403-409.