



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

BO 1235/96
Ej. 1

**"EFECTO DE LA RESERPINA EN LA
OVOGENESIS DE CARPA COMUN
(Cyprinus carpio)"**

400282



61060 1

TESIS DE LICENCIATURA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

PRESENTA :

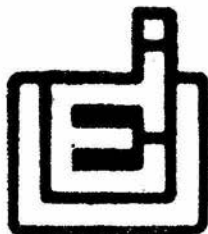
ROSA GABRIELA CEBALLOS OROZCO

DIRECTOR DE TESIS :

BIOL RODOLFO CARDENAS REYGADAS

EDO. DE MEXICO

1996





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 QUIEN INVARIABLEMENTE ACUDIMOS PARA PEDIR O ELEVAMOS UN RUEGO
PARA JUSTIFICARNOS GRACIAS SEÑOR POR TU PRESENCIA.

HEMOS DADO A LAS PALABRAS SIGNIFICADOS COMUNES,
SIN EMBARGO A LOS SENTIMIENTOS,
QUE NO SON TANGIBLES, SINO SUBJETIVOS,
CADA UNO LOS EXPRESA COMO SUS EMOCIONES
SE LO PERMITEN Y POR ESO DOY GRACIAS A ELLOS MIS PADRES
CON TODO MI AMOR POR SU INIGUALABLE ESEÑANZA.

HAN SIDO GRANDES Y PEQUEÑAS LAS COSAS QUE
CONFORMAN EL ENTORNO DE TODA UNA VIDA COMPARTIDA,
EN LOGROS Y EN FRACASOS,
EN ALEGRÍAS Y TRISTEZAS, EN RECUERDOS Y ESPERANZAS
A MIS HERMANOS MA. LUISA, MAGO, HIROKO E ISRAEL
CON EL CARÍÑO DE SIEMPRE.

A LOS EJES DEL PRESENTE Y DE MIS MAS GRANDES ANHELOS DE NUESTRO
FUTURO **MIGUEL Y MIGUELITO**, POR SU TIEMPO Y SU PACIENCIA GRACIAS
CON TODO MI AMOR.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al **Biól. Rodolfo Cárdena Reygadas**, apreciado maestro, pero gracias al amigo, por que aún más que a mi misma motivación y a su capacidad como catedrático, antepuso su calidad humana para hacer suyo el esfuerzo y mía la realidad de culminación, no de un trabajo sino de una parte de mi misma .

Gracias también a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron al termino de este trabajo, con su intrucción académica, con su apoyo, con la revisión del trabajo, con sus valiosas aportaciones, con sus consejos, con su paciencia, y sobre todo con su amistad.

Biól. José del Carmen Benítez F, Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, Biól. Mario Fernández Araiza, M en C. Regina Sánchez Merino, Biól. Carmen Alvarez Rodríguez, Prof. Raúl Gallardo, Dr. Cervantes, Biól. Hugo Ramírez Rivera, Biól. Ma. del Rocío García B. M en C. Ma. del Rosario González V, M en C. Leticia Verdín.

Y a todos mis amigos.

GRACIAS

GABY

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVOS.....	13
METODOLOGIA.....	14
RESULTADOS.....	17
DISCUCION.....	30
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	35

RESUMEN

En los peces teleósteos el hipotálamo secreta la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), cuando las gonadotropinas son liberadas actúan directamente sobre las gónadas (ovario y testículo) estimulándolas para producir gametos y hormonas esteroides.

Tratamientos con fármacos antidopaminérgicos han demostrado ser eficientes en la estimulación de la ovulación y la espermiación en diversas especies de teleósteos.

La reserpina es un fármaco que depleta a la dopamina y el presente trabajo contribuye al conocimiento de éste efecto, sobre la ovogénesis. Nuestro objetivo fue valorar histológicamente el efecto de la reserpina en la ovogénesis de la carpa común (*Cyprinus carpio*). La metodología consistió en un bioensayo con 29 carpas hembras juveniles. Al grupo experimental se le aplicaron intraperitonealmente 8 inyecciones de reserpina (1 mg/ml/kg de peso) una cada 48 h., al grupo testigo se le administró la misma cantidad de inyecciones de vehículo (propilenglicol-dimetil sulfóxido 9:1), mientras que al grupo control no se le aplicó ningún tratamiento. Una vez transcurridas 48 horas después de la última inyección los organismos fueron sacrificados, las gónadas se extrajeron y se dividieron en tres regiones (anterior, media y posterior), procediéndose inmediatamente a su fijación. Posteriormente se procesaron por la técnica histológica de rutina, tiñiéndose con hematoxilina y eosina. El conteo del número total de ovocitos se llevo a cabo por medio de microscopía óptica, contemplado todos los ovocitos de un corte en una laminilla, considerando cuatro repeticiones más, esto en cada una de las regiones (anterior, media y posterior) de la gónada, lo que da un total de 30 cortes revisados por pez. Entre cada laminilla existe una deferencia de 50µm o de 100µm dependiendo del grado de madurez del ovario; cuando la gónada no presentaba ovocitos vitelogénicos a simple vista se desecharon 50µm de tejido entre una laminilla y otra, y cuando los ovocitos vitelogénicos si se apreciaban se eliminaron 100µm. En los resultados obtenidos se aprecia un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en los ovocitos de tipo 1b en el grupo experimental con respecto a los demás grupos, lo que sugiere que éste fármaco estimula las primeras fases de la ovogénesis en la carpa común.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad que día a día va adquiriendo mayor relevancia tanto en nuestro país como a nivel mundial. Son numerosos los esfuerzos que las instituciones gubernamentales de México y organismos de apoyo internacionales (FAO), canalizan para su promoción, fomento y desarrollo; y entre ellos destacan las acciones en materia de reproducción inducida, nutrición y sanidad de diversas especies de peces, particularmente de ciprínidos, en virtud de que constituyen un grupo con amplias posibilidades para satisfacer parte de las necesidades básicas de alimentación, sobre todo en áreas rurales, donde los índices de marginación son muy elevados.

En este sentido, las líneas de investigación son muchas y muy variadas. Sin embargo, los trabajos se han enfocado en gran medida, a los aspectos de reproducción, ya que de ellos depende el suministro oportuno de crías, que sustentan los programas de siembra y repoblación tanto de cuerpos de agua como unidades de producción de todo el país.

Los métodos hasta ahora usados se dividen en dos vertientes:

- 1) La administración de extractos hipofisiarios de peces y mamíferos.
- 2) la aplicación de decapeptidos hipotalámicos y sus análogos.

El principal inconveniente de la primera vertiente, es el gran número de organismos que se requieren sacrificarse para la obtención de pequeñas cantidades de extractos hipofisiarios; la segunda presenta ciertas limitaciones, ya que su práctica resulta bastante costosa.

También la aplicación de antagonistas de la dopamina como la domperidona, el pimozide, la espiperona y sustancias que la depletan como la reserpina, han demostrado tener efectos significativos en la ovulación y la espermiación de algunas especies de teleósteos (Peter y Nahorniak, 1985; Lin, et al., 1993; Chang y Peter, 1983; Sokolowska, et al., 1988).

Hormonas

Las glándulas endocrinas o de secreción interna carecen de conductos por lo que vierten su secreción al torrente sanguíneo. Las hormonas son mensajeros químicos que se transportan a través de la sangre a otro tejido que constituye su objetivo a fin de estimular una actividad bioquímica o fisiológica específica.

Según la naturaleza química de las hormonas, varía su mecanismo de acción:

a) Las hormonas esteroideas se transportan a través de proteínas específicas que se encuentran en el plasma. Estas hormonas atraviesan con facilidad la membrana plasmática, uniéndose a una proteína receptora del citosol o del núcleo y actúan para estimular la síntesis de RNA mensajero (RNAm), lo que promueve la síntesis de proteínas específicas.

b) Las hormonas proteicas y las catecolaminas causan importantes cambios metabólicos en el tejido de los "órganos blanco", por la activación de diversos sistemas enzimáticos después de su unión a receptores específicos en la membrana.

Una vía frecuente de transducción de la señal hormonal es la utilización del 3´-5´-adenosin mono fosfato cíclico (AMPC) que actúa como un segundo mensajero para transmitir la estimulación dentro de la célula. (O´ Riordan, et al., 1988).

En los peces teleósteos la hipófisis está directamente inervada por fibras neurosecretoras; por lo que las neurohormonas provenientes del hipotálamo son liberadas directamente a la adenohipófisis o hipófisis anterior (Peter, et al., 1990).

La hipófisis anterior de los teleósteos esta constituida por tres partes, la parte rostral de la pars distalis (RPD), la proximal de la par distalis (PPD) y por último el lóbulo neurointermedio , constituido por la pars intermedia (PI) esta última se comunica con la neurohipófisis caudal. Las células lactótropas se encuentran en la RPD, las corticotrópicas sólo en los bordes entre el RPD y el PPD y las tirotropas en muchos teleósteos están repartidas en el RPD, el PPD contienen principalmente células gonadotropas y somatotropas (Omeljanuik, et al., 1987) (Peter, et al., 1990).

En los teleósteos la vascularización de la hipófisis se realiza por una o dos arterias hipofisiarias que irrigan a la neurohipófisis y al tejido neurohipofisiario. En la neurohipófisis se forma una serie de capilares llamado plexo primario que desemboca en la adenohipófisis (plexo secundario) drenando a las células endocrinas. En algunas especies se ha encontrado un sistema portahipofisiario vestigial en donde las neurosecreciones finales no terminaron en el plexo capilar primario; por lo que el transporte de neurohormonas a la adenohipófisis se da por terminales neurosecretoras que inervan al tejido. Esto contrasta con lo ocurrido en peces primitivos o filogenéticamente más antiguos en donde el sistema portahipofisiario sirve de transporte a las neurohormonas (Peter, et al., 1990).

Los estudios anatómicos de la invasión neurosecretora en la adenohipófisis muestran, que en el cuerpo de la pars distalis y la pars intermedia las terminales neurosecretoras se confinan en un conducto extravascular, separado de la células endocrinas por membranas basales y la terminación puede establecer un contacto sinaptoide directo con las células endocrinas.

Las fibras se encuentran principalmente en donde se concentran las células gonadotropas, detectando algunas otras en el lóbulo neurointermedio.

Recientemente se ha descubierto que el origen de las hormonas liberadoras de la gonadotropina, es la región anteroventral del núcleo preóptico. Lo anterior se basó en la destrucción de dicha región, lo que ocasiona que las fibras que contienen material neurosecretor entre las células gonadotropas desaparezcan, mientras el número de fibras en otra parte de la pituitaria no cambia (Peter, et al., 1990).

EL OVARIO

El ovario del pez cuenta con diferentes tipos de ovocitos:

Ovocitos de tipo 1a: Primera fase de crecimiento o estado de cromatina nucleolar. Su contenido de citoplasma es escaso, con un nucleolo único localizado centralmente (nucleolo basófilo grande).

El ovocito está completamente rodeado por unas pocas células foliculares de aspecto escamoso.

Ovocitos de tipo 1b: Estado perinucleolar. El núcleo aumenta de tamaño y aparecen múltiples nucleolos, aparentemente reflejando una amplificación de los genes ribosomales (Vicent et al., 1969; Vlad, 1976). Estos nucleolos aparecen arreglados en la periferia de la vesícula germinal.

Durante esta fase de crecimiento, muchos ovocitos de teleósteos acumulan agregaciones basófilas y material electrodensito en el citoplasma perinucleolar.

Ovocitos de tipo 2: La primera estructura que aparece en el citoplasma del ovocito durante la fase de crecimiento son las vesículas vitelinas. Estas contienen material PAS-positivo y aumentan en talla y número, teniendo movimiento periférico dentro del ovoplasma. Estudios con el pez cebrá muestran que las vesículas vitelinas incorporan rápidamente histidina y glucosa, lo que sugiere que contienen una glicoproteína que es sintetizada por el ovocito (Wallace y Sellman, 1981).

Ovocitos de tipo 3: En vertebrados no mamíferos el principal evento responsable del enorme crecimiento del ovocito comprende la captura y empaquetamiento de vitelogenina un precursor del vitelo encontrado en el plasma y que es sintetizado en el hígado. En los teleósteos la contribución relativa del depósito de la proteína vitelina en ovocitos tempranos en crecimiento esta un poco encubierta por un par de factores, que son una extensa elaboración de alvéolos corticales lo cual se inicia antes de la vitelogénesis y por el aumento de tamaño final del ovocito debido a la hidratación seguida de la vitelogénesis (Wallace y Sellman, 1981).

El material (proteínas ováricas) que se incorpora por micropinocitosis es transferido para formar esferas ó gránulos vitelinos dentro de la periferia del ovoplasma.

Ovocitos del tipo 4: Como en muchos otros vertebrados, en los peces teleósteos, los ovocitos posvitelogénicos en el ovario están fisiológicamente detenidos en la profase de la meiosis uno y no pueden ser fertilizados. Antes que los ovocitos sean fertilizados se completa la primera fase de la división meiótica. Esta fase involucra la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), la condensación y el ensamble de cromosomas en el primer uso meiótico y la expulsión del primer cuerpo polar. La meiosis es detenida en la segunda metafase y poco tiempo después los ovocitos maduros son ovulados (Nagahama, et al., 1994).

Regulación de la Ovogénesis por Gonadotropinas

En trabajos *in vitro* se ha demostrado que algunos esteroides de 21 carbonos son poderosos indicadores del rompimiento de la vesícula germinal. Estos esteroides incluyen a la progesterona (P), la 17 α hidroxiprogesterona (17 P) y la 17 α , 20 β 4-pregnen-3-ona (17,20 P) (Nagahama, 1994).

Por otra parte las gonadotropinas (GtH)s son quienes tienen los mayores efectos en el control del desarrollo ovárico en los teleósteos. Muchos estudios han mostrado la estimulación de la esteroidogénesis ovárica por la GtH. Durante la vitelogenénesis la GtH estimula la producción de 17β -estradiol, que, a su vez induce a la síntesis hepática de vitelogenina (VTG) (Tyler, et al., 1991; Fostier, et al., 1979) y el ovocito alcanza completamente su crecimiento; la GtH estimula la producción de progestágenos los que inducen a la maduración por medio de la $17\alpha,20\beta$ hidroxiprogesterona ($17,20 \beta$ -P) u hormona inductora de la maduración (MIH) la cual es encargada de activar al factor promotor de la maduración (MPF) y la ovulación (Nagahama, et al., 1994).

Se han encontrado dos tipos de GtHs, la GtH I y la GtH II, que se localizan en células separadas de la hipófisis y la tasa de síntesis de ambas varía durante el desarrollo reproductivo (Nozaki, et al., 1990a, 1990b). Aunque ambas son esteroidogénicas, la GtH II es más potente induciendo la maduración de los ovocitos a través de la hormona $17,20 \beta$ -P como se mencionó anteriormente, mientras que la GtH I tiene una función primaria en la estimulación de la vitelogenénesis comprendida dentro del desarrollo del ovocito (Tyler, et al., 1991).

Ambos tipos de gonadotropinas están formadas por dos diferentes cadenas proteicas a las cuales se les llama fracción α y fracción β . Al igual que en los vertebrados tetrapodos las gonadotropinas de peces tienen una de sus fracciones en común, es decir, una de las subunidades proteicas es idéntica para ambos tipos de gonadotropinas, (la fracción α) y su especificidad radica en la otra fracción (la β) (Cárdenas 1996).

Regulación de la Liberación de Hormonas Gonadotrópicas (GtHs)

El hipotálamo de los peces teleósteos tiene dos formas moleculares de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la GnRH del salmón que representa una variación con respecto a su homólogo de mamífero (mGnRH) en las posiciones 7 y 8

(sGnRH; [Trp⁷, Leu⁸]m-GnRH) y la GnRH equivalente a la del pollo que presenta variación con respecto a la mGnRH en la posición 5 y 8 (cGnRH-II; [His⁵, Trp⁷ Tyr⁸]m-GnRH). Ambas estimulan la liberación de la GtH y de la hormona del crecimiento (GH) por parte de la hipófisis (Huang, et al., 1991).

Habibi y colaboradores en 1992, demostraron en un experimento que el péptido cGnRH-II es más activo que el sGnRH en inducir la liberación de la GtH.

La hipófisis del pez dorado contiene dos clases de sitios de unión de GnRH: uno es de alta afinidad y baja capacidad y el otro es de baja afinidad y alta capacidad. Las dos clases de sitios de unión experimentan variaciones estacionales en su número, y son más abundantes durante la etapa de recrudescencia gonadal (Habibi, et al., 1989).

Por otro lado la acción de las catecolaminas en la liberación de hormonas en las hembras del pez dorado ha sido estudiadas por Chang et al (1985). Y al suministrarles L-β -dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA), dopamina y apomorfina causaron un incremento en los niveles de la GH en sangre y al suministrar drogas que bloquean la síntesis de las catecolaminas causan una reacción inversa, decrementando los niveles de dicha hormona.

La dopamina actúa como un inhibidor endógeno de la liberación de GtH en muchas especies de teleósteos (Peter, et al., 1988; Chang y Peter, 1983; Nahorniak et al., 1986). En pez dorado estudios *in vivo* con antagonistas de la dopamina como el pimozide y la domperidona, solos o en combinación con análogos de GnRH demuestran que la dopamina es un inhibidor espontáneo de la GnRH (Chang y Peter 1983; Omeljaniuk et al. 1987).

El aumento de la dopamina hace decrecer la capacidad del receptor a GnRH. (Peter et al 1991).

Los mecanismos a través de los cuales la dopamina inhibe la liberación de GtH en las células gonadotropas parecen estar mediados por la disminución en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y de iones de calcio intracelular (Ca^{++}) en ellas.

Los efectos estimulatorios de la norepinefrina en la liberación de GtH se han demostrado en el pez dorado tratado con dietilditio carbamato (DDC), fármaco que bloquea la conversión de la dopamina a norepinefrina, y causa un decremento significativo en los niveles de GnRH en el telencéfalo y el hipotálamo. Otros tratamientos con α - metil-p-tirosina (α MPT), que bloquea la conversión de tirosina a L-dopa, obstruyendo la síntesis de catecolaminas, causaron un incremento significativo sólo en el bulbo olfatorio (Peter, et al., 1990).

Contrariamente al efecto que la dopamina ejerce sobre las células gonadotropas, en las somatotropas tiene un efecto estimulatorio sobre la liberación de la hormona del crecimiento y la vía que se utiliza para ello es a través del receptor D_1 , hecho que ha sido corroborado por la utilización de agonistas inespecíficos como la apomorfina y de agonistas específicos como el SKF 38393 (Cárdenas R.R. 1996)

Con estas y otras bases se ha demostrado que el uso de los antagonistas de dopamina o sustancias que la depletan, solos o en combinación con análogos de GnRH son métodos efectivos para la inducción de la ovulación y la espermiación en diversas especies (Chang y Peter, 1983; Chang, et al., 1984; Sokolowska et al, 1984, 1985b; Peter, et al., 1988; Sokolowska, et al., 1988).

También se han usado drogas como la espiperona, el pimozide, la domperidona y metocloramida que bloquean la síntesis de la dopamina (Omeljaniuk et al, 1989; Sokolowska et al, 1988; Peter et al, 1988; De Leeuw, et al., 1989) ó que agotan a las catecolaminas como la reserpina (Sokoloswka, et al., 1988) y en ambos casos son efectivos para inducir la liberación de gonadotropinas en peces.

Otras sustancias que inducen la liberación de GtH son: El Ácido γ -aminobutírico (GABA). Estudios inmunohistoquímicos y bioquímicos indican que el GABA esta presente en cerebro e hipófisis de los peces teleósteos.

Trudeau et al. (1993) demostraron que inyecciones intraperitoneales de GABA ó por vía del tercer ventrículo cerebral, estimulan la secreción de la GtH II en pez dorado. En contraste de lo que pasa con mamíferos en donde el papel inhibitor del GABA controla la liberación de la hormona luteinizante (LH).

También el neuropéptido Y (NPY) es otra sustancia que juega un papel importante en la regulación de la secreción de la (LH) en los mamíferos.

Peng et al (1993) reportaron que el NPY estimula la liberación de GH y la liberación de la GtH II, en fragmentos de hipófisis de pez dorado, esto en peces sexualmente maduros en etapa de recrudescencia gonadal..

La serotonina también promueve la liberación de la GtH en la hipófisis del pez dorado, posiblemente por una acción directa sobre las gonadotropinas o inhibiendo la liberación de la dopamina del nervio terminal en la par distalis proximal (Somoza y Peter, 1991).

La GtH promueve la síntesis de $17,20 \beta$ -P en el ovario, que en turno induce a la maduración final del ovocito. La liberación de $17,20 \beta$ -P durante el período preovulatorio ejerce un primer efecto de feromona sobre los machos, actuando vía el sistema olfatorio, induciendo un incremento de la GtH en sangre, posteriormente se estimula la síntesis testicular de $17,20 \beta$ -P y aumenta el volumen de esperma y fluido seminal. Después de la ovulación, los ovocitos en el tracto reproductivo estimulan la síntesis de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) que actúa promoviendo el desove.

LA RESERPINA

Sokolowska y colaboradores en (1988) observaron los efectos de la reserpina sólo y en combinación con los análogos de GnRH en la ovulación de carpa común (*Cyprinus carpio*). Y comprobaron que se incrementan los niveles de gonadotropinas en plasma, teniendo el efecto durante 48 horas.

La reserpina es un fármaco que se obtiene de la raíz de algunas especies de *Rauwolfia*. Es un polvo cristalino, blanquecino y difícilmente soluble en agua pero soluble en ácidos orgánicos como el ácido cítrico. Es un alcaloide indólico terciario.

La reserpina agota los depósitos de varias aminas biogénicas del cerebro y otros sitios periféricos, provoca también el agotamiento de las catecolaminas (L-DOPA, noradrenalina, adrenalina y dopamina) de diferentes tejidos (Drill, 1978 ; Goodman, et al., 1986). Las catecolaminas de los tejidos se restauran lentamente, por lo tanto, en humanos las dosis repetidas tienen acción acumulativa cuando se dan a intervalos de una semana o más.

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 dopamina por los gránulos de almacenamiento que contienen a la dopamina beta-hidroxilasa.

En presencia de concentraciones suficientes de dopamina, la reserpina *in vitro* no obstaculiza la síntesis de noradrenalina, adrenalina, ni la de serotonina. Algunos farmacólogos indican, que si bien disminuye la concentración 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).

Algunas de las acciones de la reserpina en el sistema endocrino se parecen a los estados de estrés. Además la reserpina en mamíferos puede inhibir el surgimiento del estro y la menstruación, cambia la respuesta decidual uterina alterando la fecundidad y bloquea la liberación de gonadotropinas de la hipófisis (Drill, 1978).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue valorar histológicamente la influencia de la reserpina en la ovogénesis de la carpa común (*Cyprinus carpio*).

METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se utilizaron 29 hembras juveniles de carpa común (*Cyprinus carpio*) de una longitud total de 13.5 a 18 cm., las cuales fueron sometidos a dos semanas de aclimatación, en donde la temperatura se mantuvo a $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de primavera (12 h. de luz y 12 h. de oscuridad) y aireación continua. Los peces fueron alimentados ad libitum con alimento comercial balanceado para pollos de marca Purina. El experimento fue realizado en abril y mayo.

La reserpina fue preparada en una concentración de 1mg/ml., disuelta en un vehículo de propilenglicol - dimetil sulfóxido (9:1), e inyectada intraperitonealmente con jeringas insulínicas y agujas del número 26, a una dosis de 1 mg/kg.

Los peces fueron divididos al azar en cuatro grupos. Estos grupos fueron llamados según su tratamiento.

Control Inicial: Los organismos fueron sacrificados al inicio del experimento, con el fin de evaluar la condición de su estado gonadal antes del tratamiento; las gónadas fueron medidas y pesadas para obtener el índice gonado-somático utilizando la siguiente formula: $\text{peso gónada} / \text{peso organismo} \times 100$. (n = 8).

Control: Los organismos de este grupo no recibieron ningún tratamiento y fueron sacrificados al mismo tiempo que los organismos del grupo testigo y experimental. (n = 7).

Testigo: A estos peces se les aplicaron 8 inyecciones de vehículo (propenilglicol-dimetil sulfóxido 9:1) una cada 48 horas (n = 6).

Experimental: A los organismos pertenecientes a este grupo se les administraron 8 inyecciones de reserpina (1mg/kg de peso), una cada 48 horas (n = 8).

Cuarenta y ocho horas después de la última aplicación, todos los organismos fueron medidos (longitud total) y pesados al igual que las gónadas. Posteriormente se sacrificaron. Las gónadas fueron fijadas en formol neutro, después, se dividieron en tres regiones (anterior, media, y posterior), se lavaron en agua corriente y se deshidrataron en alcoholes graduales para su inclusión en parafina. De cada región de la gónada se realizaron 5 cortes no seriados con un intervalo entre ellas de 50 o 100µm dependiendo de la madurez del ovario a simple vista (cuando hubo un predominio de ovocitos previtelogénicos fue de 50µm y por el contrario si predominaban los ovocitos vitelogénicos fue de 100µm). Los cortes se llevaron a cabo con la ayuda de un microtomo rotatorio tipo Minnot, las laminillas fueron teñidas con la técnica de hematoxilina y eosina (HyE).

Las preparaciones fueron examinadas con ayuda de un microscopio compuesto Carl Zeiss, se realizaron conteos de la cantidad de ovocitos previtelogénicos (estadios 1A, 1B, y 2) y de ovocitos vitelogénicos (estadios 3 y 4), según los criterios de Wallace y Sellman (1981).

Para obtener los datos del número total de ovocitos que se registraron por grupo, se realizaron conteos de todos los ovocitos presentes en los cortes en ambas gónadas, para cada pez y finalmente se efectuó la sumatoria del número de ovocitos de cada tipo contados en todos los organismos que integraban un tratamiento

Finalmente se tomó la medida del diámetro de cada tipo de ovocitos (1a, 1b, 2, 3 y 4), midiendo 25 células de cada uno con una reglilla micrométrica de 2 mm y sacando posteriormente el promedio en cada tipo \pm su error estándar.

Las pruebas estadísticas utilizadas para procesar los datos obtenidos, fueron la de ANOVA ($p < 0.05$) y la de comparaciones múltiples de Turkey.

RESULTADOS

Los índices gonadosomáticos (I.G.S) muestran un ligero incremento únicamente en el grupo tratado con vehículo (grupo testigo) en comparación con los otros grupos, sin embargo, estos datos no presentan diferencias significativas (ANOVA $p < 0.05$) (tabla 1, figura 6). El tratamiento con reserpina no causó ningún aumento en el peso de la gónada ni en el índice gonadosomático con respecto al grupo testigo

Las gónadas de todos los peces utilizados en el experimento presentaron en términos generales un aspecto inmaduro, correspondiente a organismos juveniles.

Al examinar los cortes histológicos se observaron diferentes tipos de ovocitos (1a, 1b, 2, 3 y 4), cada uno con características particulares como ya antes se había mencionado (figuras 1, 2, 3, 4 y 5). Al obtener las medidas de cada tipo de ovocito, encontramos que el diámetro para los ovocitos de tipo 1a fue de $0.027 \pm 0.001\text{mm}$, mientras que para los ovocitos de tipo 1b fue de $0.151 \pm 0.027\text{mm}$; en el caso de los ovocitos de tipo 2 fue de $0.300 \pm 0.013\text{mm}$; y para los ovocitos de tipo 3 y 4 fue de 0.800 ± 0.031 y $0.958 \pm 0.015\text{mm}$ respectivamente.

En la tabla 2 se representa el número total de ovocitos contados en cada grupo, y nos permite observar que la mayor cantidad de ovocitos se registran en el grupo experimental y específicamente en los tipos 1a, 1b y 2, a pesar de que el número de organismos difiere en cada grupo.

En la tabla 3, los datos permiten ver claramente una tendencia hacia el incremento en número de ovocitos especialmente para los de tipo 1b en el grupo experimental con respecto a los otros grupos. Otros datos que podemos señalar con respecto a esta tabla, es que si comparamos la población de ovocitos presente en las hembras del grupo control inicial con las de los otros grupos, es fácilmente observable un

incremento, aún tratándose del control, al cual no se le aplicó ningún tratamiento. Por otro lado si comparamos al grupo control con los organismos tratados con vehículo podemos apreciar que en éste último el número de ovocitos en algunos tipos (1a, 2 y 3) disminuye. Finalmente si comparamos al grupo experimental con todos los demás, encontramos un incremento en los ovocitos de tipo 1a, 1b y 2.

En este casos (el número de ovocitos por pez) los datos fueron usados para determinar el valor porcentual que representaba cada grupo con respecto a nuestro control, al que consideramos el 100% (tabla 4).

En nuestro experimento las células de tipo 1b fueron las más abundantes en todos los grupos estando en una proporción de 4 a 8 veces más en relación a las demás que le siguieron en número (ovocitos de tipo 1a).

Finalmente los resultados revelaron que el aumento en los ovocitos de tipo 1b en el grupo experimental no fue debido al azar, sino que es una visible respuesta a la reserpina.

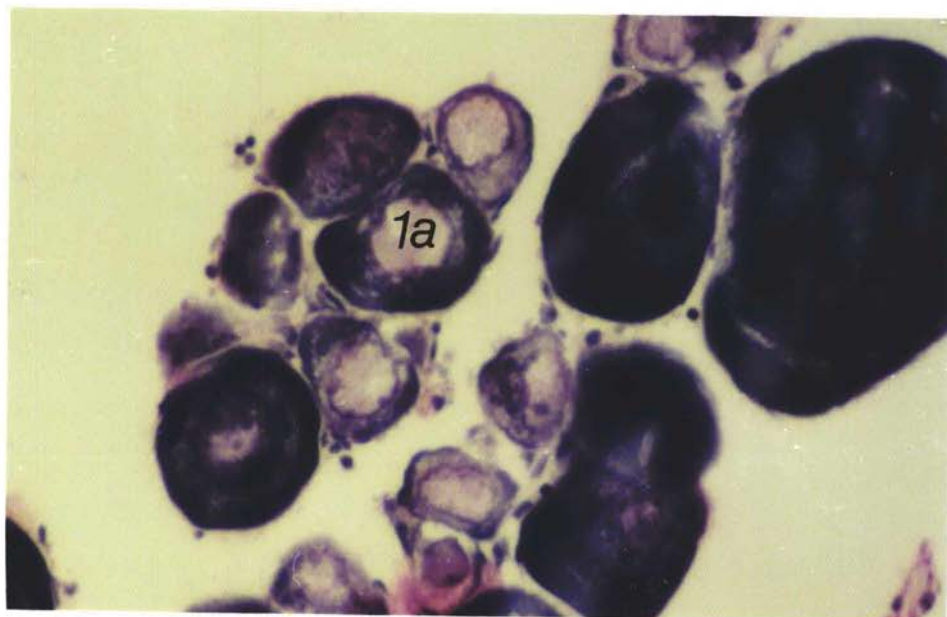


Figura 1. Fotografía de ovocitos que se encuentran en la primera fase del crecimiento o en estado de cromatina nucleolar. Estos ovocitos presentan un único nucleolo localizado centralmente. (X 800, H y E).

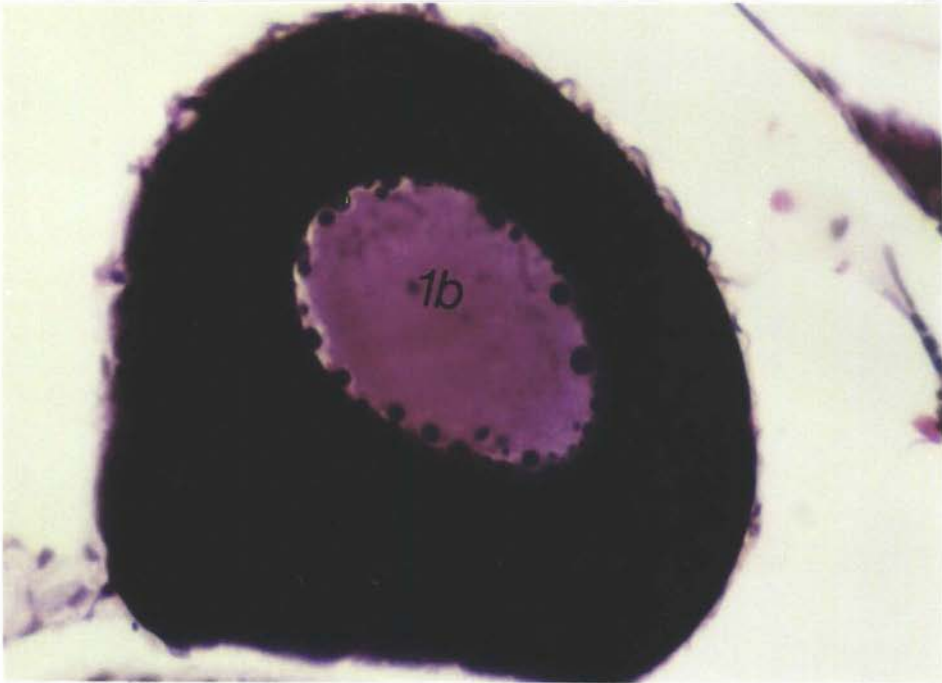


Figura 2. Fotografía de un ovocito en estado perinucleolar (tipo 1b), el cual muestra múltiples nucleolos que aparecen arreglados en la periferia de la vesícula germinal. Este es el tipo de ovocito que aparece con mayor frecuencia en el grupo experimental (X 200 , H y E)



Figura 3. Fotografía de un ovocito de tipo 2, en el cual podemos apreciar la presencia de vacuolas vitelinas en la periferia del ovocito y la también de algunos nucleolos localizados centralmente. Presenta a un ovocito de tipo tres en donde los gránulos vitelinos se hacen presentes (X 80, H y E).

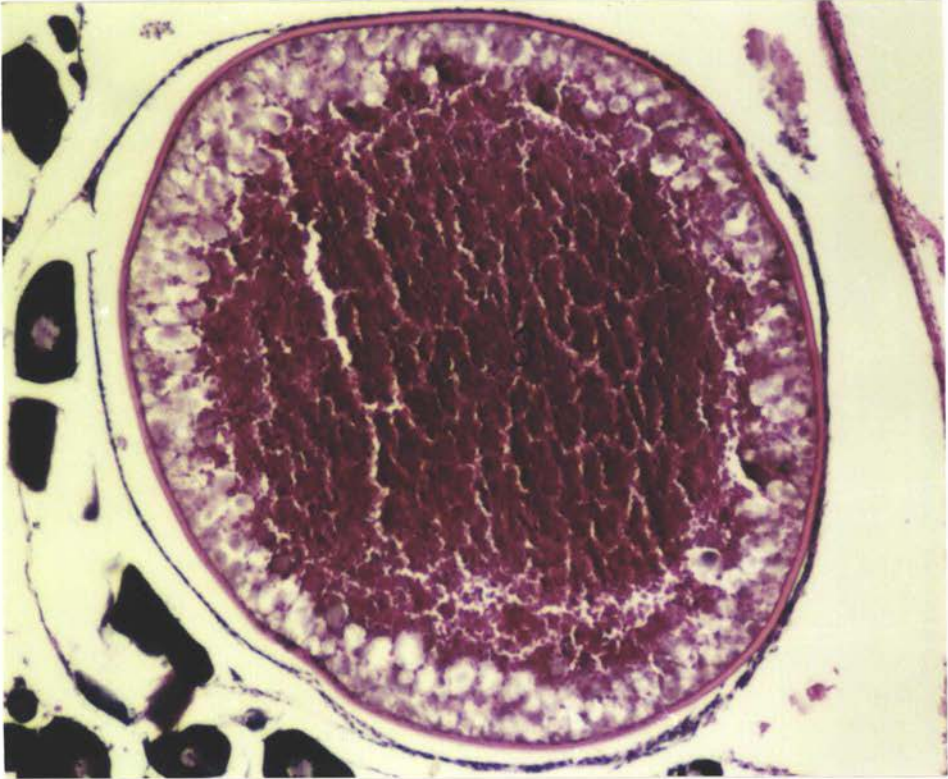


Figura 4 . Fotografía de un ovocito en estado de acumulación de vitelo (tipo 3). El cual permite ver la acumulación de gránulos vitelinos en el centro del ovocito y en la periferia del mismo se aprecian algunas vacuolas vitelinas (X 80, HyE).

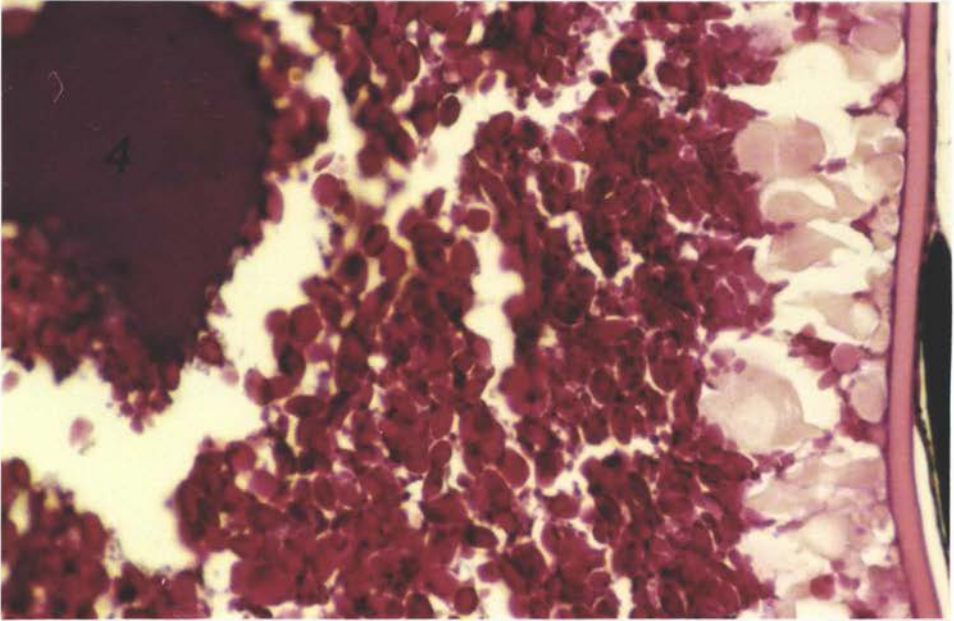


Figura 5. Fotografía de un ovocito maduro (tipo 4). En el cual se aprecia la ruptura de la vesícula germinal, que es el principal indicador del inicio de la fase de división meiótica (X 80, H y E).

GRUPOS	PT	PG	IGS
EXPERIMENTAL n=8	54.19	2.45	4.37 ± 1.63
TESTIGO n=6	47.87	3.00	6.22 ± 2.23
CONTROL n=7	48.43	1.69	3.84 ± 1.86

Tabla 1. Influencia de la reserpina sobre el índice gonadosomático. Se observa el peso total (PT) de cada organismo, el peso de ambas gónadas (PG) y el índice gonadosomático (I.G.S), obteniendo la media más, menos su error estandar ($\bar{x} \pm EE.$). La prueba estadística con la que se manejaron los datos fue la de ANOVA ($p < 0.05$) y no mostró diferencia significativa entre cada grupo.

Ovocitos	Exp.	Test.	Cont.	Cont. Inic.
1a	17,727	6199	13,889	5,534
	16*	11.3*	23.5*	12.0*
1b	88,253	44945	41,055	38,295
	79.6*	82*	69.4*	84.0*
2	2,437	778	1,809	643
	2.2*	1.4*	3.0*	1.4*
3	571	628	1,532	160
	0.005*	1.1*	2.6*	0.0035*
4	1,810	2255	901	955
	1.6*	4.1*	1.5*	2.0*
TOTAL	110798	54805	59184	45587

Tabla 2. Número total de cada tipo de ovocitos contados por grupo y proporción de cada población de ovocitos. En esta tabla se puede observar como la población de ovocitos de tipo 1b en el grupo experimental es mayor que en los otros, aunque el número de organismos que constituye cada grupo difiere entre cada tratamiento (grupo experimental n=8, grupo testigo n=6, grupo control n=7 y grupo control inicial n=8). El asterisco indica el valor de cada tipo de ovocito con respecto al total de todos los tipos de ovocitos de cada grupo expresado en porcentaje.

Ovocitos	EXP.	TEST.	CONT	CONT. INIC.
1a	2,215.9 ± 484.4	1,033.2 ± 228.6	1,984.1 ± 852.5	691.8 ± 226.1
1b	11,031.6 ± 2457.0	7,490.8 ± 1790.5	5,865.0 ± 987	4786.9 ± 1454.9
2	304.6 ± 230.9	129.7 ± 47.3	258.4 ± 258	80.4 ± 52.1
3	71.4 ± 37.1	104.7 ± 56.7	218.9 ± 149.2	20 ± 14.8
4	226.3 ± 123.9	375.8 ± 172.5	190.1 ± 133	119.4 ± 79

Tabla 3. Efecto de la reserpina sobre el número de ovocitos de cada tipo por organismo. Aquí podemos apreciar una tendencia al aumento en las células de tipo 1a, 1b y 2 en el grupo tratado con reserpina, aunque la única diferencia estadísticamente significativa se presentó en los ovocitos de tipo 1b en el grupo experimental con respecto al grupo control inicial (ANOVA $p < 0.05$ y prueba de comparaciones múltiples de Turkey). Se presenta la $\bar{x} \pm EE$.

GRUPO	1a	1b	2	3	4
CONTROL	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
CONTROL INICIAL	34.86	81.61	31.10	9.10	62.78
TESTIGO	52.07	127.72	50.17	47.82	197.60
EXPERIMENTAL	111.67	188.09	117.87	32.61	118.98

Tabla 4. Porcentajes de los valores obtenidos como cada tipo de ovocitos por pez. Estos resultados se obtuvieron considerando a nuestro grupo control como el 100% y muestran las diferencias entre cada tipo de ovocito y cada grupo.

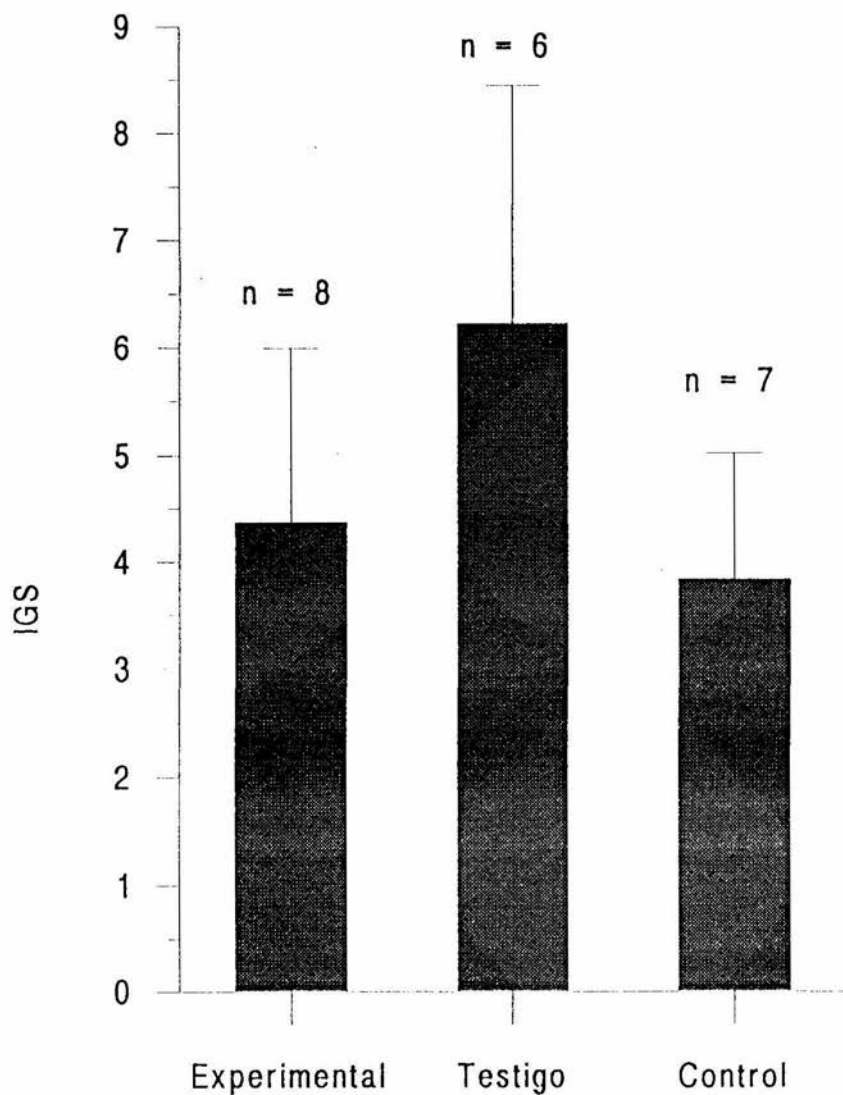


Fig. 6 Influencia de la reserpina sobre el índice gonadosomático de los diferentes grupos, pudiendo observar que no existe una diferencia estadísticamente significativas ANOVA ($p < 0.05$) entre ninguno de los tratamientos.

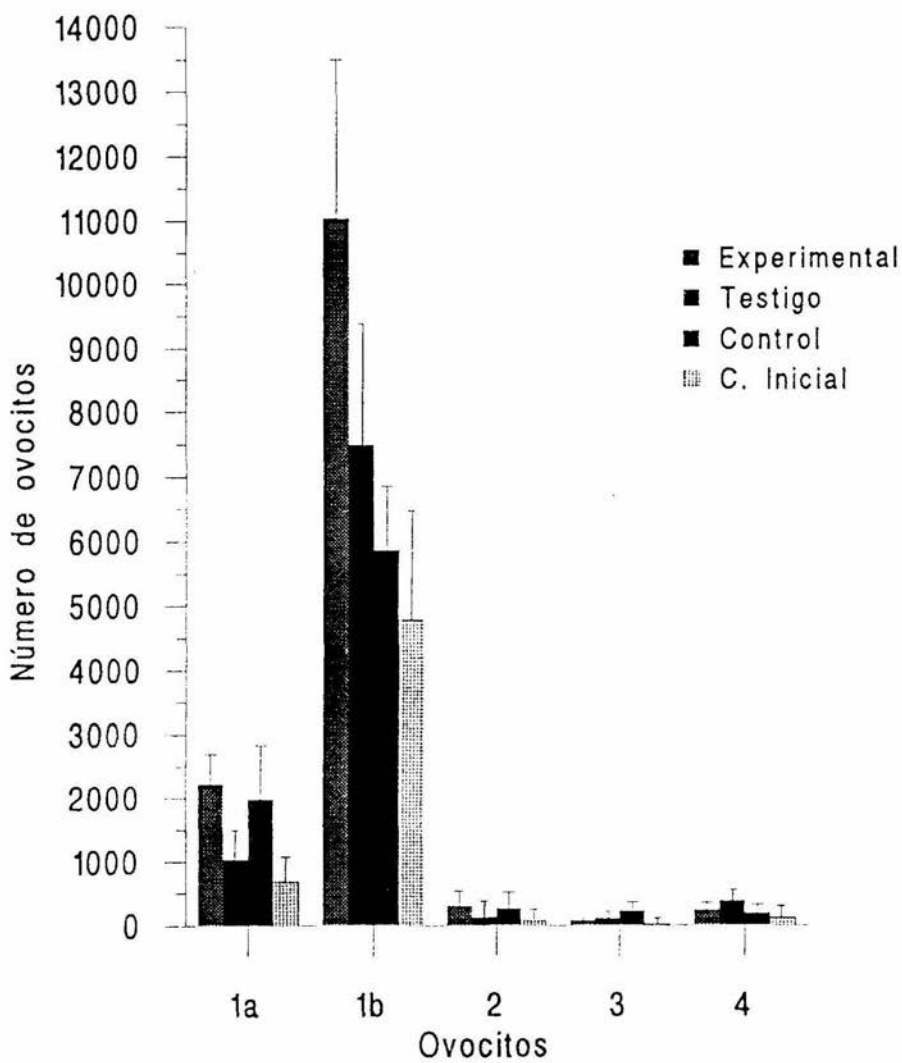


Fig 7 .- Efecto de la Reserpina sobre el número de ovocitos de cada tipo por organismo, en donde observamos un aumento en los ovocitos de tipo 1b del grupo experimental ANOVA ($p < 0.05$)

DISCUSIÓN

Como era de esperarse en un experimento de esta naturaleza la desviación estándar de la media para los IGS en todos los grupos fue relativamente alta debido a las variaciones intrínsecas de cada uno de los organismos que constituían el lote.

En el ovario de peces se pueden encontrar células en diferentes etapas de la ovogénesis. Usualmente los criterios que indican que los ovocitos están en crecimiento implican la reactivación de fenómenos celulares entre los que se encuentra la acumulación de vitelo, cambios en el citoplasma y aparición de vesículas vitelinas entre otros. El que algunos de estos fenómenos se vayan dando en la mayoría de los ovocitos nos señalan el despertar masivo del órgano (ovario) el cual se esta preparando para la reproducción.

Es conveniente mencionar que el número de ovocitos que se encuentra en el ovario, es consecuencia de la proliferación de ovogonias, y estas por medio de mitosis y diferenciación se transforman en ovocitos primarios, los que posteriormente dan origen a los ovocitos secundarios. Podría sugerirse que las GtH tienen un efecto directo sobre las ovogonias, aunque no existe ningún reporte bibliográfico de esto .

Con lo que respecta a las comparaciones hechas entre la población de los ovocitos en el grupo control inicial contra los otros grupos, los datos nos indican que el tiempo por si solo tiene un efecto sobre el crecimiento gonádico, mientras que la comparación del grupo control con el testigo, muestra que estrés podría haber ejercido una influencia sobre la ovogénesis, disminuyendo algunos tipos de ovocitos.

Por otro lado, en el grupo de hembras a las que se les inyectó reserpina los ovocitos comenzaron el proceso de diferenciación, si bien los cambios fueron incipientes en esa dirección. Esto pudiéramos suponer que se debió a que la cantidad de gonadotropinas secretadas en los organismos juveniles tratados con reserpina pudo no

haber sido lo suficientemente alta como para activar completamente y de manera rápida la ovogénesis, pues es sabido que para la realización de dicho proceso se requieren mayores cantidades de GtH que para la activación de la espermatogénesis ya que en experimentos similares se indujo a la activación de la espermatogénesis en machos juveniles de carpa común por la influencia de la reserpina a las mismas dosis empleadas en este trabajo (García B, 1994). Definitivamente el hecho anterior, así como los hallazgos reportados por Chang (1983) en los cuales se señala que la secreción de GtH por fragmentos de hipófisis de pez dorado, es inducida por la acción de la reserpina; así mismo Sokolowska en 1985, demostró que la hipófisis de carpa presenta un comportamiento similar al encontrado por Chang en el pez dorado. De la misma manera Sokolowska et al (1988) descubrieron que la reserpina sola aumenta los niveles de GtH en el suero en carpas de ambos sexos, y en el caso de los machos favorece a la espermiación. En las hembras únicamente se logró la ovulación aplicando la reserpina en combinación con análogos de la GnRH, en ambos casos se utilizaron carpas sexualmente maduras. También los hallazgos de González (1994), quien demostró que en carpas machos juveniles de aproximadamente de 200 g. de peso el número de células gonadotropas se incrementa 700 % sobre el grupo control, así como el hecho de que éstas células presentan un 50 % más de volumen. Todo esto nos hace pensar que el aumento en la población de ovocitos de tipo 1b es consecuencia de la aplicación de reserpina.

Como ya antes fue explicado la reserpina agota a las concentraciones de catecolaminas en 24 horas, y éstas son restauradas lentamente; por lo tanto al aplicar dosis repetidas se da una acción acumulativa (Chang y Peter, 1983 ; Drill 1978). Por lo que se puede decir que en el presente trabajo se logro el agotamiento de la dopamina de sus reservas tisulares y por lo tanto un incremento en la liberación de GtH.

Además, la dopamina provoca un decremento en la capacidad de los receptores a GnRH, por lo tanto pequeñas cantidades de esta GnRH tienen un mayor efecto en las células gonadótropas para la síntesis y liberación de GtH (Peter et al 1991 ; Omeljaniuk et al 1989a).

Cuando los resultados obtenidos en la tabla 3, se procesaron en porcentajes se mostró un incremento en el tipo de células 1b, sugiriendo nuevamente una activación de la ovogénesis. El incremento del 88.09% en el tipo de ovocitos antes mencionado del grupo experimental sobre el grupo control y 61% sobre el grupo testigo, creemos que no puede ser considerado como azaroso, aunque la prueba de ANOVA ($p < 0.05$) no reveló una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con reserpina y los grupos testigo y control. Consideramos que la reserpina si esta activando el proceso de ovogénesis, aunque probablemente se requería una mayor cantidad de aplicaciones para obtener variaciones estadísticamente significativas. Otra alternativa es realizar experimentos en los cuales se incremente la dosis de reserpina a objeto de evaluar si a mayor concentración de esta sustancia es posible obtener más cantidad de GtH en suero y con ello una inducción más rápida y significativa de la ovogénesis.

Si bien, en nuestro experimento no tenemos registros directos de una elevación de GtH durante el periodo de tiempo que duro el trabajo, los datos de los autores ya mencionados nos hacen creer que esto fue lo que ocurrió y nos dio como diferencia el número de ovocitos 1b en el grupo experimental con respecto a los otros grupos, pues el comportamiento de los datos en el número total de ovocitos por grupo y el número de cada tipo de ovocitos por pez son muy similares. Sugiriendo una activación de la ovogénesis temprana.(figura 6 y 7).

De esta manera la reserpina parece ser un candidato viable para activar la gametogénesis en carpa común, tanto en machos (García 1994; González 1994) como en hembras, si bien se requieren experimentos en piscifactorías que nos demuestren las bondades de ésta forma de inducción contra otras, también será interesante evaluar si el comportamiento reproductivo de las carpas comunes en ambos sexos no resulta modificado por la supresión de la dopamina, ya que la reserpina no tiene un efecto selectivo sobre la hipófisis y con ello la posibilidad de que en otras vías del sistema

nervioso central la dopamina éste ausente es grande y ello se refleje entre otras situaciones en el comportamiento.

Un aspecto interesante de comentar es que en todos los ovarios revisados encontramos la presencia de ovocitos atrésicos de tipo 2, que aunque no se cuantificaron, en los grupos control y control inicial aparecieron con menor frecuencia. Quizá este hecho pueda deberse al estrés originado por la manipulación de los organismos, el cual podría haber influido en la proporción de la secreción de GtHI y II, promoviendo que esta última estuviera presente en cantidades ligeramente superiores a las normales, lo cual induciría a las células de la teca y de la granulosa a producir 17β 20, P que a su vez podría promover una madurez precoz y al no estar presente en el resto de las condiciones celulares adecuadas causara este fenómeno. Otra probable causa sería que al darse un incremento súbito en las poblaciones celulares, los niveles de oxígeno disuelto en el agua no fueron lo suficientemente altos como para permitir el buen desarrollo celular. En la realización de experimentos posteriores sería recomendable cuantificar los ovocitos atrésicos, con el fin de evaluar las posibles causas que los originan.

CONCLUSIONES

- 1) La reserpina promovió un incremento en la población de los ovocitos de tipo 1b.
- 2) La reserpina es un buen candidato para inducir a la ovogénesis en peces como la carpa común.

BIBLIOGRAFIA

Ahikam G., Levavi-Sivan B., Rubin-Kedem H. Ofir M., Yaron Z. (1991) The effect of gonadotropin releasing hormone superactive analog and dopamine antagonists of gonadotropin level and ovulation in tilapia hybrids. *ISR Journal of Aquacultur. 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. Supp.* 3: 11-21.

Billard, R.; Breton, R. Dubois, M. P. (1971) Immunocytologie et Histochimie des Cellules Gonadotropes et Thyroïdiques Hypophysaires chez la Carpe *Cyprinus carpio* C.R. hrbd Seanc.. Acad. Sci., Ser. D. 272: 981-983.

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

Breton B.; Gac L.F.; Sambroni E. (1986) Gonadotropin Hormone (GtH) Receptors in the Ovary of de Brow Trout (*Salmo trutta* L). "in vitro" Studes. *Gen. Com. Endocrinol.* 64: 163-171.

Cardenas R. R. (1996) Regulación Endocrina de la Reproducción y el Crecimiento en Peces . *Ciencia y Desarrollo* En Prensa.

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. *Regul. Pept.* 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*. **Neuroendocrinology.** **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*. **Neuroendocrinology.** **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. **Neuroendocrinology.** **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. *J. of Neurochem.* **58**(6) 2254-2262.

Dulka, J.G.; Soley, B.D.; Stacey, N.E.; Peter, R.E. (1992) Ad 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.

Fostier A.; Breton B.; Jalabert.B.; (1979) Stimulation Hypophysaire the Secretion Estradiol - 17 β Chez The carpe commune (*Cyprinus carpio*). *Ann. Endocrinol* **40**: 83-84.

García B.M. de R. (1994) Efecto de la Reserpina en la Espermatogénesis de Carpa común (*Cyprinus carpio*). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztacala.

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-Ad on Goldfish Gonadotropin Release "in vitro". *Endocrinology.* **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. *Biochem. and Biophysic. Resear. Communic.* **193**(2): 711-717.

González S.L: (1994) Valoración Histológica del Efecto de la Reserpina Sobre las Células Gonadotropas de Carpa común (*Syprinus carpio*) . Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztacala.

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, R. (1990). Photoaffinity Labeling of pituitary Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors in the 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. **Regul. Pept.** **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 Injecction 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. Suppl.** **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.

Itoh, H.; Suzuki, K.; Kawachi, H. (1990) The complete amino acid Sequences of alfa 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.

Kagawa H.; Young G.; Adachi S.; Nagahama Y. (1982) Estradiol 17- β Production in Amago Salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) Ovarian Follicles: Role of the Thecal y Granulosa Cell. **Gen. Comp. Endocrinol.** **84**: 291-299.

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

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

Kawauchi, 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.

King J.A.; Millar R.P. (1985) Multiple Molecular Forms of Gonadotropin-Releasing Hormone in Teleost Fish Brain **Peptides** **6**: 689-694.

Kraak, G.V.D.; Roseblum, 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**: 223-239.

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

Lin H.R.; Peter R.E. (1990) Fish Physiology, Fish Toxicology and Fisheries Management. Proceeding of an International Symposium, Guangzhou, PRC.

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

Nagahama Y.; Yoshikoni M.; Tanaka M. (1994) Regulation of Oocyte Maturation in Fish. *Fish Physiol*. **XIII**: 393-431

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. *Molec. Cell. Neuroscienc*. **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. *Gen. Comp. Endocrinol*. **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*). *Gen. Comp. Endocrinol*. **77**, 358-367.

Omeljaniuk R.J. Tonon M.C. Peter R.E. (1989) Dopamine Inhibition of Gonadotropin and α -Melanocyte Stimulating Hormone Release "in vitro" from the Pituitary of the Goldfish (*Carassius auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol*. **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.

O`Riordan H.L.J; Malan G.P; Gould P.R. (1988) Edit Limusa S.A. de C.V. México.

Peng, Ch.; Huang, Y.P.; Peter, R.E. (1990) Neuropeptide Y stimulates Growth Hormone and Gonadotropin Release from the Goldfish Pituitary "*in vitro*". **Neuroendocrinology**. **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. **Endocrinology**. **134** (4): 1820-1829.

Peter, R.E. (1981) Gonadotropin Secretion During Reproductive Cycles in Teleosts: Influences of Environmental 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. **Prog. Comp. Endocrinol.** 393-398.

Peter, R.E.; Kei-Li, Y.; Marchant, T. (1990) Direct Neural Regulation of the Teleost Adenohypophysis. **J. Exp. Zool. Suppl.** **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. Acad. Sin., 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 Steroides 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.

Peter, G.W.J.; Van Oordt. (1987). Modern trends 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.

Roseblum, 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.; Pan C.H.; Chang J.P.; Crim L.W.; Weil C.; (1984) Induction of Ovulation in goldfish (*Carassius auratus*), by pimozide and analogues of LH-RH. *Aquaculture* **36**: 77-83

Sokolowska, M.; Peter, R.E.; Nahorniak, C.S.; Chang, J.P. (1985b) Seasonal Effects of Pimozide and des-Gly (D-Ala) LHRH Ethylamide on Gonadotropin Secretion in Goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **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*). *Rep. Nutr. Develop.* **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. *Gen. Comp. Endocrinol.* **82**, 103-110.

Stacey N.E.; Sorensen P.W.; Dulka J.G.; Cardwell J.R.; Irvine A.S.; (1991) Fish Sex Pheromones: Current Status and Potential Applications. Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica: Monograph 16: 189-227

Thomas, P. (1990) Telost Model for Studying the Effects of Chemicals on Female Reproductive Endocrine Function. **J. Exp. Zool. 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) Mecanismos 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. Norwick, U.K.

Trudeau, V.L.; Peter, R.E.; Sloley, 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 común (*Cyprinus carpio*) and Chinese loach (*Paramisqurnus 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. **Neuroendocrinology.** 56: 483-490.

Trudeau, V.L.; Sloley, 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 Mechanisms. **J. Neuroendocrinol.** 5: 129-136.

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

Trudeau, V.L.; Sloley, 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.

Tyler C.R.; Sumpter J.P.; Swanson P.; (1991) Involvement of Gonadotropin in the Uptake of Vitellogenin into Vitellogenic Oocytes of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) **Gen. Comp. Endocrinol** 84: 291-299.

Vicent, W.S.; Halvorson H.D.; Chen H.R; Shin D. (1969). Acomparison of Gene amplification in uni-and Multinucleolate Oocytes. **Exp. Cell. Res.** 57: 240-250.

Vlad, M. (1976) Nucleolar DNA in Oocytes of (*salmo irideus*) Cell. Tissue. Res. 167: 407-424.

Wallace A.R.;Selmank. (1981) Cellular and Dynamic Aspects of Oosite Grow in Teleost. Amer.Zool. 21: 325-343.

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. Endocrinology. 130 (3): 1201-1210.

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

Yaron, Z. (1995) Endocrine Control of Gametogenesis and Spawning Induction in the carp. Aquaculture 129: 49-73.

Yu, K.L.; Peter, R.E. (1990) Alterations in Gonadotropin-Releasing Hormone Immunoactivities en 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.; Roseblum, 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. Gen. Comp. Endocrinol. 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 Hypotalamus and Pituitary "in vitro". Gen. Comp. Endocrinol. 85: 138-146.