

91



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

CAMPUS " I Z T A C A L A "

CUANTIFICACION DE CELULAS GONADOTROPAS  
EN LA HIPOFISIS DE PEZ DORADO (*Carassius  
auratus*) BAJO EL EFECTO DE LA RESERPINA.

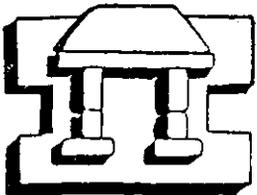
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A :**

**GABRIELA ALEJANDRA OSORNIO PALMA**



DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. RODOLFO CARDENAS REYGADAS

290833

IZTACALA LOS REYES IZTACALA

2001



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 Dios por darme la vida,  
haber iluminado mi camino,  
la gracia y la felicidad.

A mis padres,  
que me enseñaron lo que vale el cariño y la ternura.  
Gracias a su apoyo, amor y comprensión  
sembraron la confianza en mi ser.

A mi hermano Juan Carlos,  
quien me da su cariño y estímulo para seguir adelante.

A mis abuelitas,  
por su eterno cariño que me han tenido.

A todos mis tíos, tías, primos y primas,  
quienes de una forma u otra me han apoyado con su cariño.

## AGRADECIMIENTOS.

Al M. en C. Rodolfo Cárdenas Reygadas, por permitirme ingresar a su Laboratorio, por su apoyo para la realización del presente trabajo. Por su amistad, comprensión y paciencia.

A la Biol. Mónica Chavez Maldonado, por su amistad, paciencia y apoyo brindado durante todo este tiempo.

Al Biol. José del Carmen Benitez Flores, por su amistad y apoyo en la revisión de este trabajo.

Al Biol. Hector Barrera Escorcia y al M. en C. Sergio Chazaro Olvera, por sus sugerencias y comentarios para el enriquecimiento de este trabajo.

Al Biol. Jorge Gersenowies por su ayuda en el manejo e interpretación de los resultados.

Al Biol. Alfonso Flores Merchant, la preparación y amistad en la víspera de mi profesión.

A todos mis amigos del Laboratorio de Histología, que de alguna manera me apoyaron.

A todos los profesores de la Carrera que influyeron en la formación de mi vida profesional.

A mis amigos: Enrique, Alfredo, Eduardo, Francisco, Gustavo, Verónica, Beatriz, Benigno, José Luis, Norman, Julio, Josué y Agustín.

En especial a mi amigo Alberto, por sus comentarios y apoyo.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
A. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN HORMONAL.....	1
B. HIPÓFISIS.....	3
1. Gonadotropinas en teleósteos.....	4
2. Técnicas utilizadas para su localización e identificación.....	6
C. FACTORES QUE ESTIMULAN LA LIBERACIÓN DE GTH.....	7
1. GnRH.....	7
D. NEUROPEPTIDOS Y NEUROTRANSMISORES QUE ESTIMULAN LA SECRECIÓN DE GTH.....	9
1. Neuropeptido Y (NPY).....	9
2. Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA).....	9
3. Norepinefrina (NE).....	10
4. Serotonina (5-HT).....	10
E. OTROS FACTORES QUE AFECTAN LA SECRECIÓN DE GTH.....	10
1. Esteroides sexuales).....	10
F. FACTORES AMBIENTALES QUE INFLUYEN EN LA SECRE- CIÓN DE GTH.....	11
1. Temperatura.....	11
G. FACTORES QUE INHIBEN LA LIBERACIÓN DE GTH.....	12
1. Dopamina (DA).....	12
H. FÁRMACOS INDUCTORES DE GAMETOGÉNESIS Y/O ESPERMATOGÉNESIS.....	13
* Modelo de la regulación neuroendocrina.....	15
I. JUSTIFICACIÓN.....	17

<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>19</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>36</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

PDR.....	<i>Pars distalis rostralis</i>
PDP.....	<i>Pars distalis proximalis</i>
PI.....	<i>Pars intermedia</i>
GtH.....	Gonadotropinas
GtH-I.....	Gonadotropina vitelogénica
GtH-II.....	Gonadotropina maduracional
GnRH.....	Hormona liberadora de gonadotropinas
sGnRH.....	GnRH de salmón
cGnRH.....	GnRH de pollo
sbGnRH.....	GnRH de besugo
PmGnRH.....	GnRH de besugo rojo
cfGnRH.....	GnRH de pez gato
GH.....	Hormona de crecimiento
GnRH-R.....	Receptor de GnRH
PLC.....	Fosfolipasa C
DG.....	Diacilglicerol
IP3.....	Inositol trifosfato
PKC.....	Cinasa C
Ca <sup>++</sup> e.....	Calcio extracelular
Ca <sup>++</sup> i.....	Calcio intracelular
VSCC.....	Voltaje
AA.....	Ácido araquidónico
PLA2.....	Fosfolipasa A2
AMPc.....	Adenosín monofosfato cíclico
NPY.....	Neuropéptido Y
GABA.....	Ácido $\gamma$ -amino butírico
NE.....	Norepinefrina
5-HT.....	Serotonina
T.....	Testosterona
E2.....	Estradiol
11-KT.....	11-cetotestosterona
DA.....	Dopamina
D2.....	Receptor tipo D2 de dopamina
LH.....	Hormona luteinizante
LHRH-A.....	Análogo de la hormona liberadora de LH
FSH.....	Hormona foliculoestimulante
PRL.....	Prolactina
TSH.....	Hormona tirotrópica
ACTH.....	Adrenocorticotropina
IgG.....	Inmunoglobulina
PBS.....	Solución amortiguadora de fosfatos

## RESUMEN

En teleósteos, el control de la secreción de GtHs es multifactorial, siendo el principal estimulador la GnRH, mientras que el inhibidor más importante es la dopamina. Fármacos antidopaminérgicos han mostrado ser efectivos para estimular la ovulación y espermiación en diversas especies. La reserpina al ser una sustancia que depleta la dopamina, aumenta los niveles de GtH en suero con una sola dosis de 1 mg/Kg de peso. Con ocho aplicaciones de esta misma dosis se demostró un efecto importante sobre la cantidad de células gonadotropas en hipófisis de carpa común. Por lo cual se cuantificó la variación en el número de células gonadotropas del pez dorado (*Carassius auratus*) con diferente número de aplicaciones de reserpina, encontrándose para el grupo control 415 células, 434 células para el testigo, y al compararlos con los grupos experimentales se vio una diferencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en todos los casos, obteniéndose un aumento considerable de más de 2 veces (289%) hasta casi 4 veces más (388%) en el número de células gonadotropas. Sin embargo, podría bastar con una segunda aplicación para que el número de células gonadotropas se vea aumentado en un 289% sin necesidad de aplicar hasta la octava inyección. Por lo que, la reserpina inyectada intraperitonealmente ocasiona una mayor liberación de gonadotropinas, y de esta manera, pudiese inducir la espermatogénesis en Ciprinidos para poder tener utilidad en la acuicultura.

## INTRODUCCIÓN

La utilización de alimentos para la población humana mundial depende en buena medida de los recursos acuáticos. Es por ello que el hombre ha desarrollado la piscicultura para obtener una mayor producción de crías de los cultivos que se han constituido como una importante fuente de alimento, cubriéndose así las necesidades económicas, culturales y sociales de las cuales depende.

Las técnicas de mantenimiento, crecimiento y reproducción de los peces ha ido cobrando importancia y se ha pasado de técnicas con las cuales se mantenía a las especies y tan sólo se extraía una parte de su población, a otras en las que se aplica el control de los factores ambientales, el manejo del ciclo reproductivo, y más recientemente a la aplicación de sustancias que promueven el crecimiento o la reproducción de la especie. Para ello se han desarrollado métodos de inducción a la maduración y puesta utilizándose antagonistas dopaminérgicos, los cuales tienen una influencia sobre el sistema neuroendócrino hipotalámico e hipofisiario.

### **A. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN HORMONAL.**

El eje endocrino reproductivo involucra la actividad regulatoria de hormonas hipotalámicas, hipofisarias y gonádicas. Entre las primeras se encuentra la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual estimula la síntesis y liberación de gonadotropinas, que son las que a su vez inducen tanto la gametogénesis como la espermatogénesis por parte de las gónadas. Algunos factores ambientales (por ejemplo: temperatura, fotoperíodo, variaciones en la osmolaridad) son percibidos por el organismo a través de receptores, los cuales comunican dichas variaciones al sistema nervioso central. Esta información es procesada y enviada a diferentes partes del sistema nervioso, especialmente al hipotálamo, donde se modifica la producción y la liberación de sus hormonas, que en peces son transportadas a través de los axones para la entrega de GnRH a las células gonadotropas de la hipófisis, es decir, en este grupo de vertebrados, se presenta una inervación directa por parte del hipotálamo a la hipófisis (Bello, 1993; Peter *et al.*, 1990, 1991; Van Oordt y Peute, 1983). Existen múltiples formas moleculares de GnRH en

el cerebro de los teleósteos, las cuales han sido confirmadas por el conocimiento de la secuencia peptídica de GnRH deducida a partir de cDNA en varias especies (Cuadro 1). Dos de ellas, la GnRH de salmón (sGnRH) y la GnRH-II de pollo (cGnRH-II) se han confirmado en el cerebro del pez dorado bajo el uso de técnicas bioquímicas (Yu *et al.*, 1988, 1997a,b) y análisis de cDNA (Lin y Peter, 1996, 1997), las cuales en estudios previos se ha reportado que estimulan la liberación de las gonadotropinas (GtH) y de la hormona de crecimiento (GH) (Marchant *et al.*, 1989; Peter *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 1995).

GnRH	Especie	Referencia
sGnRH	<i>Haplochromis burtoni</i>	Bond <i>et al.</i> 1991
	<i>Salmo salar</i>	Klungland <i>et al.</i> 1992
	<i>S. trutta</i>	Klungland <i>et al.</i> 1992
	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Klungland <i>et al.</i> 1992
	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Klungland <i>et al.</i> 1992
	<i>O. masou</i> *	Amano <i>et al.</i> 1991
	<i>O. nerka</i>	Coe <i>et al.</i> 1995
	<i>O. mykiss</i> *	Okuzawa <i>et al.</i> 1990
	<i>Sparus surats</i>	Gothilf <i>et al.</i> 1995
	<i>Carassius auratus</i>	Yu <i>et al.</i> 1988*; Lin y Peter 1996
	<i>Porichthys notatus</i>	Grober <i>et al.</i> 1995
	<i>Pagrus major</i>	Okuzawa <i>et al.</i> 1991
	<i>Morone saxatilis</i>	Gothilf <i>et al.</i> 1995
<i>Brachydanio rerio</i>	Powell <i>et al.</i> 1996	
cGnRH-II	<i>Clarius gariepinus</i>	Bogerd <i>et al.</i> 1992
	<i>Haplochromis burtoni</i>	Bond <i>et al.</i> 1991
	<i>Carassius auratus</i>	Yu <i>et al.</i> 1988*; Lin y Peter 1996
	<i>Sparus surats</i>	Gothilf <i>et al.</i> 1995
	<i>Morone saxatilis</i>	Gothilf <i>et al.</i> 1995
	<i>O. masou</i> *	Amano <i>et al.</i> 1991
	<i>O. mykiss</i> *	Okuzawa <i>et al.</i> 1990
sbGnRH	<i>Haplochromis burtoni</i>	Bond <i>et al.</i> 1991
	<i>Sparus surats</i>	Gothilf <i>et al.</i> 1995
	<i>Morone saxatilis</i>	Gothilf <i>et al.</i> 1995
cfGnRH	<i>Clarius gariepinus</i>	Bogerd <i>et al.</i> 1992

Cuadro 1. Teleósteos donde se ha reportado la presencia de GnRH deducida a partir de cDNA y/o por técnicas bioquímicas\*. GnRH (Hormona liberadora de gonadotropinas), sGnRH (GnRH de salmón), cGnRH (GnRH de pollo), sbGnRH (GnRH de besugo) y cfGnRH (GnRH de pez gato) (Yu *et al.*, 1997b)

## B. HIPÓFISIS.

La hipófisis es una de las glándulas que participa en el control hormonal de la reproducción. Se localiza en la base del diencefalo, por detrás del quiasma óptico y delante del saco vasculoso. Con un doble origen, una parte deriva directamente del sistema nervioso, llamándosele neurohipófisis, la otra, esta formada por la evaginación ectodérmica del techo de la cavidad bucal embrionaria y es conocida como adenohipófisis. Esta última, secreta 6 diferentes hormonas (GH, ACTH, TSH, FSH, LH), y en peces, se le reconocen 3 partes: una rostral o *pars distalis rostralis* (PDR), otra más caudal o *pars distalis proximalis* (PDP) que contiene a las células gonadotropas y somatotropas, y un *pars intermedia* (PI). La actividad de las células productoras de gonadotropinas está regulada por neurohormonas de origen hipotalámico y esteroides sexuales, teniendo así una importante posición en el eje que sirve para asegurar la reproducción (Eckert *et al.*, 1990; Espinosa y Labarata, 1986; Peter *et al.*, 1990; Van Oordt y Peute, 1983).

Por otro lado, en la mayoría de las especies de teleósteos, la ovulación se asocia con un aumento en la secreción de las GtH-II, lo cual sugiere que la GnRH puede jugar un importante papel en la regulación de la ovulación en peces. En donde el mecanismo de activación para la liberación de GtH inducido por la GnRH parece involucrar una proteína G, la cual activa a la fosfolipasa C (PLC), con la consecuente producción de diacilglicerol (DG) y posiblemente de inositol trifosfato (IP3). El primero activa a la cinasa C (PKC), mientras que el IP3 ocasiona la liberación del calcio intracelular de sus depósitos (Chang *et al.*, 1993).

Tanto la GnRH del salmón (sGnRH) como la GnRH de pollo (cGnRH-II) pueden aumentar los niveles de calcio intracelular ( $Ca^{++i}$ ) y el calcio extracelular ( $Ca^{++e}$ ) también puede activar la liberación de gonadotropinas. Para ello, parecen activarse canales de calcio sensibles al voltaje (VSCC) de tipo "L" cuando el sistema es inducido con GnRH. Otra posible vía por la cual parece favorecerse la liberación de gonadotropinas, es por un aumento en los niveles de ácido araquidónico (AA) mediado por la fosfolipasa A2 (PLA2) (Chang *et al.*, 1993).

## 1. Gonadotropinas en Teleósteos.

Se ha encontrado que las gonadotropinas en los peces teleósteos son de dos tipos: la gonadotropina vitelogénica (GtH-I) y la gonadotropina maduracional (GtH-II). Ello fué establecido por primera vez para células gonadotropas de hipófisis de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa de madurez sexual, por medio de técnicas inmunocitoquímicas (Naito *et al.*, 1991; Nozaki *et al.*, 1990a,b). Posteriormente, se reveló que ambas hormonas se encontraban en células diferentes durante todas las etapas del ciclo reproductivo, en donde las células que producen GtH-I aparecen antes de la madurez, es decir, en peces inmaduros, durante los estadios tempranos de la espermatogénesis en machos, y en estadios previtelogénicos, vitelogénicos y durante la ovulación en hembras. Las células que producen GtH-II aparecen durante la espermatogénesis y espermiación (Nozaki *et al.*, 1990b). Los resultados de los estudios realizados por Suzuki *et al.*, (1987, 1988) y Swanson *et al.*, (1989, 1991) quienes por radioinmunoensayo (RIA) obtienen la cantidad de GtH liberada desde la hipófisis reportan altos contenidos de GtH-I, en suero de salmón (*Oncorhynchus keta*) y en plasma de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) respectivamente, durante los estadios tempranos de espermatogénesis y vitelogénesis, mientras que el contenido de GtH-II es mayor en las fases tardías (durante la maduración de ovocitos y ovulación) y en la espermiación. De manera similar, Amano *et al.*, (1992, 1995) reporta cambios en los niveles de GtH II en plasma de salmón masu (*Oncorhynchus masou*) similares a los vistos por Swanson *et al.*, (1989, 1991). Tanaka *et al.*, (1993) observa que los niveles de GtH II en besugo rojo se incrementan durante toda la vitelogénesis y durante la temporada de ovulación, mostrando cambios diurnos en asociación con la maduración final del ovocito durante la ovulación. Estudios recientes de Kagawa *et al.*, (1998a) realizados en el besugo rojo, indican que la GtH-II del besugo rojo (PmGtH-II) induce la maduración final de los ovocitos. Estudios de hibridación *in situ* en trucha arcoiris por Naito *et al.*, (1991) y Gómez *et al.*, (1999) reportan que los niveles de RNAm para la subunidad  $\beta$  de la GtH es básicamente similar a lo sugerido para los contenidos plasmáticos en salmónidos, en donde la GtH-I es producida y liberada para el desarrollo gonadal en etapas tempranas y la GtH-II exclusivamente en etapas tardías.

El pez dorado es un pez de ovoposición múltiple, por lo que se esperaría que la producción y liberación de GtH-II sea diferente de aquellos que presentan una ovoposición anual. Cook y Peter (1980) reportaron un alto contenido de GtH-II en hipófisis y en plasma de hembras sexualmente maduras o en recrudescencia tardía. Kobayashi *et al.*, (1988) observa una elevación en los niveles plasmáticos de GtH-II durante la vitelogénesis y en la ovulación. Sin embargo, debido a que los estudios se han enfocado a la GtH-II, no existe información sobre el contenido plasmático de GtH-I en pez dorado, siendo necesario el desarrollo de sistemas de medición para la GtH-I para esclarecer como se involucra en el desarrollo gonadal del pez. Actualmente, cuando la expresión de RNAm para GtH-I $\beta$  y II $\beta$  fueron examinados por hibridación con Northern blot en diferentes estadios de la maduración ovárica (inmaduro, madurando, maduro y en regresión) en pez dorado, mostraron un incremento en ambos niveles de RNAm en relación al desarrollo gonadal y decrementaron con la regresión gonadal, pero el gen II $\beta$  parece ser más alto que el I $\beta$  en todos los estadios (Yoshiura *et al.*, 1997).

En peces, como en el resto de los vertebrados, las gonadotropinas son glicoproteínas heterodiméricas ya que ambos tipos de gonadotropinas están formados por 2 diferentes cadenas protéicas, llamadas fracción  $\alpha$  y fracción  $\beta$ . La primera es una fracción común, proteína idéntica para ambos tipos de gonadotropinas y la especificidad radica en la segunda fracción ( $\beta$ ). Ambas fracciones requieren interactuar a fin de proporcionar la actividad biológica de la molécula de GtH (Suzuki *et al.*, 1988).

La fracción  $\alpha$  de ambas gonadotropinas de peces es 65% similar al ser comparada con el mismo tipo de fracción de bovino. También se ha establecido un cierto grado de similitud entre las fracciones  $\beta$  de las gonadotropina de pez con respecto a las hormonas en mamíferos. Por lo que la GtH-I $\beta$  es similar a la fracción  $\beta$  de la hormona folículo estimulante (FSH) de bovino(39%) y un 32 % de similitud a la hormona luteinizante (LH) de bovino. La GtH-II $\beta$  es más parecida a la fracción  $\beta$  de la LH (39%) que a la misma fracción de la FSH (34%) (Kawauchi *et al.*, 1989).

En salmónidos, se ha demostrado la presencia en las gónadas de receptores específicos para cada uno de los dos tipos de hormonas, GtH-RI para ambas (en células de Sertoli) y GtH-RII para la GtH-II (en células de Leydig), quedando por establecer cuales son los mecanismos de transducción de estos receptores sobre las células que los poseen (Miwa *et al.*, 1994).

Recientemente, se han caracterizado los sitios de unión a GnRH en el ovario de pez dorado, demostrándose por medio de los altos niveles de RNAm de sGnRH y del bajo contenido de cGnRH expresados en el tejido ovárico en etapa de regresión, madurez y recrudescencia sexual coincidiendo con la presencia de RNAm de estas dos formas en el cerebro (Lin y Peter, 1996).

## **2. Técnicas utilizadas para su localización e identificación.**

Se han empleado técnicas de tinción diferencial, inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas para la localización e identificación de células hipofisarias.

González (1994), localiza a las células gonadotropas en la hipófisis (PDP) de la carpa común (*Cyprinus carpio*) mediante la utilización de técnicas de tinción diferencial para conocer el efecto de la reserpina con una octava aplicación, y Kagawa *et al.*, (1998b) la emplea para identificar los diferentes tipos de células en la hipófisis del atún de aleta azul (*Bluefin tuna*).

Se han realizado diversos estudios para identificar y localizar células adenohipofisarias en la hipófisis de vertebrados bajo el uso de técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, con el fin de demostrar que estas técnicas sirven para el reconocimiento de células. El empleo de inmunocitoquímicas se ha llevado a cabo en aves por Mohanty *et al.*, (1997a), con anticuerpos contra hormonas sintéticas hipofisiales de mamífero (anti-LH de ovino, anti-PRL de humano, anti-TSH de humano, anti-GH de humano), anticuerpo secundario e incubación con el complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) para identificar los diferentes tipos celulares en la *pars distalis* (PD); en anfibios, Pearson *et al.*, (1998), utiliza diversos anticuerpos (anti-TSH de humano, anti-LH $\beta$  de humano o tortuga, anti-FSH $\beta$  de humano, anti-GH de bovino), un segundo anticuerpo biotilinado e incuba con el

conjugado de avidina-biotina (ABC) y para microscopía electrónica, emplea anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro, con ambos métodos distingue células adenohipofisarias en la PD; en peces, Kagawa *et al.*, (1998b) ocupa anticuerpos específicos para las subunidades  $\beta$  de las GtHs (GtH-I, GtH-II), un anticuerpo secundario biotilado e incuba estreptavidina con peroxidasa de rábano (HRP) y Oliverreau *et al.*, (1883), aplica un anticuerpo primario (anti-GtH de salmón), un segundo anticuerpo e incuba con el complejo peroxidasa-antiperoxidasa para conocer la distribución de las gonadotropas en la hipófisis de diversos teleósteos; y el manejo de técnicas inmunohistoquímicas en reptiles con varios anticuerpos primarios (anti-LH $\beta$  de humano, porcino u ovino, anti-PRL de ovino, anti-TSH de humano, anti-GH de humano), un segundo anticuerpo e incubados con el complejo peroxidasa-antiperoxidasa para identificar las células adenohipofisarias (Naik *et al.*, 1980; Batista *et al.*, 1989; Mohanty *et al.*, 1997b).

Todos estos estudios reportan que la distribución de las células gonadotropas (GtH) se encuentran en la PD y, en peces teleósteos se encuentran en la *pars distalis proximalis* (PDP) (Oliverreau *et al.*, 1883), y la GtH-II $\beta$  en la parte central de la PDP y en el borde externo de la *pars intermedia* (PI) del atún de aleta azul (Kagawa *et al.*, 1998b). Basados en la identificación y localización de tipos celulares, esto es, estudios cualitativos. Existiendo un reporte sobre la cuantificación de células gonadotropas en hipófisis de carpa común realizado por González (1994), por medio del empleo de una tinción diferencial.

## **C. FACTORES QUE ESTIMULAN LA LIBERACIÓN DE GTH.**

### **1. GnRH.**

Estudios recientes realizados por Yu *et al.*, (1998) reportan que la coexistencia de diferentes formas de GnRH (sGnRH y cGnRH-II) y receptores de GnRH (GnRH-R) en tejido nervioso y gonadal, determinado ello, por la expresión de sus RNA mensajeros. Esto, apoya la noción de que las GnRHs funcionan como neurotransmisores y/o neurohormonas en el cerebro y como sustancias autocrinas y/o paracrinas en el tejido gonadal, además del papel neuroendocrino previamente establecido en la hipófisis del pez dorado.

Se ha podido saber sobre el papel de la GnRH dentro, del funcionamiento ovárico como la reiniciación de la meiosis en el ovocito, la presencia de un alto contenido de los sitios de unión en la hipófisis durante la etapa de recrudescencia gonadal, y en la producción de testosterona inducida por la GtH en pez dorado (Habibi *et al.*, 1988, 1989a,b). Sin embargo, es necesaria más información sobre la fisiología del sistema neuronal que contiene la GnRH en el cerebro de teleósteos durante el momento de la ovulación. Los cambios en los niveles de GnRH del cerebro asociados con la estimulación de la secreción de la GtH-II en la hipófisis durante el desove han sido descritos sólo en la trucha café (*Salmo trutta*, Salmonidae), el pez dorado (*Carassius auratus*) y la rubia (*Rutilus rutilus*, Cyprinidae) (Chang *et al.*, 1993; Peter *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1997b).

Además, se ha demostrado en la hipófisis de pez dorado, la presencia de fibras de GnRH, como sGnRH y cGnRH-II, lo cual sugiere que estas formas podrían funcionar como factores hipofisiotrópicos en el pez (Kim *et al.*, 1995). Kobayashi *et al.*, (1994) reporta que las formas de GnRH (sGnRH y cGnRH-II) de origen nervioso terminal (TN) no son esenciales en la maduración gonadal y en la ovulación. Sin embargo, se ha reportado que estas formas, son quienes estimulan la secreción de GtH siendo la cGnRH-II con una mayor actividad sobre la liberación de gonadotropinas (Chang *et al.*, 1990, 1993; Habibi *et al.*, 1988), y que hay receptores similares a ambas formas en las células GtH para estimular su secreción (Habibi *et al.*, 1991; Cook *et al.*, 1991). También se ha observado que sGnRH y el agonista sGnRH-A estimulan la liberación de GtH, relacionado con el contenido de GtH plasmático en carpa común en regresión y recrudescencia sexual (Lin *et al.*, 1993). Breton *et al.*, (1998) reportó altos niveles de GnRH en hipófisis de trucha durante el desarrollo ovárico (en la iniciación de la vitelogénesis). Coincidiendo con lo reportado por Davies *et al.*, (1999) sobre los altos contenidos en la hipófisis de sGnRH y de GtH I presentes en la iniciación de la vitelogénesis en trucha arcoiris. También Amano *et al.* (1997) presentó evidencia para sugerir que un incremento temporal de sGnRH promueve la proliferación inicial de espermatogonias durante la maduración precoz en salmones machos (*Oncorhynchus masou*), estimulando así la espermatogénesis y la esteroidogénesis en las gónadas. Similarmente, Holland *et al.* (1998) reportó que la GnRH de besugo está involucrado en la regulación del la secreción de GtH II y en el desarrollo gonadal.

Rodríguez *et al.*, (2000), analiza 3 formas de GnRH (sbGnRH, sGnRH y cGnRH-II) en róbalo marino europeo (*Dicentrarchus labrax*) macho, encontrando altos niveles de las tres formas cuando las gónadas comienzan a diferenciarse, asociando el alto contenido de GnRH de besugo (sbGnRH) con el incremento de los niveles de GtH II durante la espermiación, sugiriendo que esta forma de GnRH es la más relevante en el control de la ovulación del pez, estimulando la síntesis de GtH II y, la secreción y liberación de esteroides.

#### **D. NEUROPEPTIDOS Y NEUROTRANSMISORES QUE ESTIMULAN LA SECRECIÓN DE GtH.**

La secreción de GtH es estimulada también por un número de factores neuroendocrinos, como el neuropéptido Y (NPY), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), norepinefrina (NE) y serotonina (5-HT).

##### **1. Neuropéptido Y (NPY).**

Existen fibras inmunopositivas al NPY en relación con las células gonadotropas en pez dorado (Kah *et al.*, 1989). Los fragmentos de hipófisis de pez dorado en etapa de recrudescencia tienen una mayor magnitud de respuesta al NPY que en peces en regresión, indicando la existencia de una respuesta a la variación estacional (Peng *et al.*, 1990). Pero en trucha arcoiris, tiene un efecto estimulador en la liberación de GtH en hembras maduras y un efecto inhibitorio en hembras en recrudescencia (Breton *et al.*, 1989).

##### **2. Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA).**

El uso de inyecciones intraperitoneales de GABA (300 $\mu$ g/g) estimulan un incremento en los niveles de GtH-II en suero a los 30 min. después de la inyección (Trudeau *et al.*, 1993). Estudios en machos maduros de pez dorado muestran que el tratamiento con  $\gamma$ -vinil-GABA (inhibidor GABA transaminasa) causan un incremento en los niveles tisulares de GABA que inducen un incremento en la liberación de GtH-II en suero (Kah *et al.*, 1993).

### **3. Norepinefrina (NE).**

Tratamientos con NE por inyección intraperitoneal o intraventricular en el cerebro, han causado un incremento en los niveles de GtH en suero de peces en etapa de regresión sexual y en recrudescencia ovárica temprana (Chang y Peter, 1984; Peter *et al.*, 1986, 1991). Dado que no se ha detectado NE en la hipófisis del pez, el significado funcional de esta molécula es desconocido y cabe la posibilidad que durante el cortejo aumenten los niveles de NE en suero y favorezca así la secreción de GtH.

### **4. Serotonina (5-HT).**

Esta tiene un efecto estimulador sobre la liberación de GnRH del pez dorado de la región hipotalámica anterior-preóptica en el cultivo estático de fragmentos de cerebro (Yu *et al.*, 1991). Inyecciones con SE en pez dorado causan un incremento en los niveles de GtH en suero, con una gran respuesta en la preovulación en hembras y en la preespermación en machos (Somoza *et al.*, 1988). Así como el incremento de dosis de 5-HT (10nM-10µM) en la perfusión de células hipofisarias estimulan la liberación de GtH pero inhiben la liberación de la hormona de crecimiento (GH) de manera dosis-dependiente (Wong *et al.*, 1998).

## **E. OTROS FACTORES QUE AFECTAN LA SECRECIÓN DE GtH.**

### **1. Esteroides sexuales.**

Kobayashi *et al.*, (1989) encontraron que la liberación de GtH puede ser inducido en pez dorado con ooforectomía, al implantarles T o E2. Experimentos con peces gonadectomizados se incrementa la secreción de GtH, mientras que aquellos que a su vez reciben un tratamiento de esteroides (progesterona o estradiol) la cantidad de GtH secretada es menor (Trudeau *et al.*, 1991, 1992) sugiriendo que éstas modulan a la secreción de gonadotropinas. Así como, Kobayashi y Stacey (1990, 1993) reportan una elevación de GtH-II en el plasma causado por la ooforectomía y el uso de esteroides sexuales, como la testosterona y el estradiol bajan los elevados niveles en pez dorado. Sin embargo, Saligaut *et al.*, (1998) demuestran que tratamiento con E2 en trucha aircoiris hembra inmadura o vitelogénica con pimozide, incrementa la concentración de GtH-II en plasma. Trudeau *et al.*, (1993), observan que el estradiol y la testosterona causan un incremento en los valores

de DA en la región preóptica cerebral-telencéfalo y en la hipófisis de pez dorado hembras, en etapa de recrudescencia sexual.

Estudios recientes con esteroides en pez gato africano sugieren que la 11-cetotestosterona (11-KT) juega un papel en la regulación de la maduración testicular, como el de promotor en la espermatogénesis y en la espermiación (Cavaco, 1998; Schulz y Goos, 1999). Cerdá *et al.*, (1997), observa cambios en el contenido de 11-KT en plasma relacionados con la iniciación de la espermiación en besugo, y Zanuy *et al.*, (1999) encuentra que la T acelera la diferenciación gonadal e interviene en la estimulación de la espermatogénesis en besugo. Sin embargo, Rodríguez *et al.*, (2000) reporta altas concentraciones de T en fases tempranas de diferenciación sexual en róbalo marino europeo, coincidiendo con los altos niveles de GnRH en hipófisis y los elevados niveles basales de GtH II.

Además de la presencia de testosterona en machos, la presencia de otros esteroides es necesaria para algunos eventos. Ejemplo de ellos son la  $17\alpha, 20\beta$  4-pregnen-3-ona ( $17,20\beta$  P) y su epímero  $20\alpha$  (Nagahama *et al.*, 1994), que son sustancias importantes para aumentar el pH del conducto espermático. Este cambio en el pH parece aumentar por algún mecanismo las concentraciones de AMPc, lo que tiene como consecuencia un aumento en la motilidad del esperma (Yaron, 1995).

Machos de pez dorado que acompañan a hembras ovulando, presentan un incremento en los niveles de plasma de GtH después de 12 horas, en respuesta a las feromonas secretadas por las hembras, específicamente el esteroide del ovocito  $17\alpha, 20\beta$  dihidroxy-4-pregnon-3-1 (Dulka *et al.*, 1987) y la prostaglandina- $F2\alpha$  (Kyle *et al.*, 1985; Yu y Peter, 1990). La prostaglandina- $F2\alpha$  inyectada en machos incrementa las concentraciones de GnRH en el bulbo olfatorio, telencéfalo y en el hipotálamo después de 2 horas (Yu y Peter, 1990).

## **F. FACTORES AMBIENTALES QUE INFLUYEN EN LA SECRECIÓN DE GtH.**

### **1. Temperatura.**

Kobayashi *et al.*, (1997), observaron incrementos en los niveles de RNAm de GtH II $\beta$  a temperatura de 20° C asociándose con el período de maduración en pez dorado, coincidiendo con los resultados obtenidos por Sokolowska *et al.*, (1985) sobre los niveles

de GtH en suero de carpa común (*Cyprinus carpio*) durante la ovulación. Sin embargo, Santos *et al.*, (1986) reportó que en carpas el contenido de GtH plasmático se incrementó durante la ovulación, de manera sincrónica con el aumento de la temperatura de 16° C a 24° C.

## **G. FACTORES QUE INHIBEN LA LIBERACIÓN DE GtH.**

### **1. Dopamina (DA).**

En ciprinidos y algunas otras especies de teleósteos, la catecolamina llamada dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina, DA) es el principal inhibidor de la liberación de GtH, confirmado por Chang *et al.*, (1983, 1984a,b) al utilizar inyecciones con DA y apomorfina (agonista de DA) y, con análogos de la hormona liberadora de LH (LHRH-A) y pimozide. La DA es sintetizada a partir de la tirosina, también es precursor metabólico inmediato de la noradrenalina y adrenalina, siendo un neurotransmisor central de importancia en la regulación del movimiento. El punto principal de síntesis de la dopamina (DA) es la región preóptica anteroventral y es liberada en las inmediaciones de las células gonadotropas. Como se mencionó anteriormente, esta sustancia funciona como el principal factor inhibidor de la liberación de la GtH-II en pez dorado, y en otros peces teleósteos, ejerciendo su efecto a través del receptor D<sub>2</sub> en la hipófisis anterior. Otro mecanismo de inhibición se da por interacciones axo-axonales de las fibras de DA sobre las fibras de GnRH provocando a su vez un descenso en la cantidad de gonadotropinas que son liberadas por la hipófisis (Billard *et al.*, 1983; Chang *et al.*, 1984a,b; Omeljaniuk *et al.*, 1987; Peter *et al.*, 1986, 1991; Yu y Peter, 1991, Trudeau y Peter, 1995). Los mecanismos a través de los cuales la DA inhibe la liberación de GtH en las células gonadotropas parecen estar mediados por el bloqueo a nivel de la movilización de iones de calcio intracelular [Ca<sup>++</sup>], por inhibición de la proteína cinasa C (PKC) o por una disminución en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Chang *et al.*, 1993).

La regulación neurohormonal binaria de la secreción de GtH-II por la acción de la GnRH y de la DA, ha dado las bases para el desarrollo de una técnica altamente efectiva de la ovulación inducida en peces cultivados. Especialmente en ciprinidos, se han utilizado inyecciones intraperitoneales o intramusculares de análogos de GnRH (sGnRH-A) o

análogos de LHRH (LHRH-A) combinados con un antagonista dopaminérgico (domperidona o pimozide) para eliminar la influencia inhibitoria de la DA sobre la liberación de la GtH-II en la hipófisis (Peter *et al.*, 1988, 1991). Esta combinación estimula la ovulación dada por la GtH-II en el pez dorado y en la carpa común (Lin *et al.*, 1987; Sokolowska *et al.*, 1985), siendo efectiva en la inducción de la espermiación y ovulación en pez dorado (Chang *et al.*, 1984b; Sokolowska *et al.*, 1984, 1985; Peter *et al.*, 1987).

#### **H. FÁRMACOS INDUCTORES DE GAMETOGÉNESIS Y/O ESPERMATOGÉNESIS.**

Estudios con domperidona, un antagonista del receptor subtipo-2 de la dopamina, muestran un cambio en la capacidad del receptor a GnRH en la hipófisis de pez dorado después de 24 h. (Omeljaniuk *et al.*, 1989). Tratamientos con esta sustancia, incrementan los niveles de gonadotropinas en suero en peces en etapa de recrudescencia (Sloley *et al.*, 1990).

Estudios recientes muestran que se puede bloquear la síntesis de catecolaminas (como la DA) con metil-p-tirosina (MPT), incrementando la concentración de GtH-II en la sangre en hembras vitelogénicas. Antagonistas de la DA como el pimozide o sustancias que disminuyen su concentración como la reserpina, son capaces de estimular la liberación de la GtH-II tanto en truchas hembras en fase vitelogénica, como hembras inmaduras implantadas con estradiol (E<sub>2</sub>) (Saligaut *et al.*, 1998).

Estudios realizados en pez dorado con pimozide demuestran que aumenta los efectos del análogo de la hormona liberadora de LH (LHRH-A) o de la hormona liberadora de gonadotropinas de salmón (sGnRH) sobre la liberación de GtH aumentando la concentración en suero, en pez dorado hembra sexualmente maduras o en recrudescencia a 12° C (Chang *et al.*, 1984b; Peter *et al.*, 1987) y en hembras maduras a 20° C (Sokolowska *et al.*, 1985).

La reserpina es un alcaloide obtenido de la raíz de algunas especies de *Rauwolfia*, que depleta los depósitos de catecolaminas en los tejidos periféricos y de noradrenalina, dopamina y serotonina en el sistema nervioso central. La depleción empieza una hora después de su administración y es máxima a las 24 horas; desaparece lentamente por lo que

las dosis repetidas tienen un efecto acumulativo (Rodríguez, 1984). La droga interfiere con la entrada de monoaminas a los depósitos intracelulares y en el almacenamiento intracelular de las catecolaminas. La disminución de la síntesis de norepinefrinas inducida por la reserpina puede deberse al bloqueo de la captación de la dopamina por los gránulos de almacenamiento que contiene la enzima dopamina beta-hidroxilasa (Drill, 1978).

La reserpina es capaz de inducir un aumento en el número y en el volumen de las células gonadotropas en carpas juveniles, por medio de la aplicación de diferentes dosis (0.5mg/Kg, 1 mg/Kg y 1.5 mg/Kg), encontrando que la primera dosis incrementa 4 veces más el número de células; la segunda dosis incrementa 7 veces más, y la última dosis es menor que la primera y el volumen de las células gonadotropas en carpas juveniles para la primera dosis se incrementa 120 % más con respecto a los controles, la segunda se incrementa 150 % más y un 108% para la última (González, 1994). También tiene efecto sobre espermatoцитos secundarios en testículo de juveniles de carpa común ocasionando un incremento en el número de cistos (García, 1994), pero a las dosis aplicadas no tiene efecto alguno sobre hembras juveniles (Ceballos, 1996). No obstante, se ha reportado que con una dosis de reserpina de 1mg/Kg de peso en carpas sexualmente maduras aumenta la cantidad de semen y la concentración de gonadotropinas en el suero, efecto que empieza a disminuir a las 48 horas después de la aplicación (Sokolowska *et al.*, 1988).

Lin *et al.*, (1985) demostró que la reserpina incrementa los efectos de la LHRH-A sobre los niveles de gonadotropinas en suero y la ovulación en carpa común a temperatura de 20° C a 28 ° C. Todo esto nos muestra que la reserpina puede servir como un inductor en la gamatogénesis, además de ser un fármaco accesible que responde con y sin análogos de GnRH.

Debido a la falta de investigación sobre los diversos aspectos de la regulación neuroendocrina de la secreción de GH, se muestra un modelo de dicho sistema (Peter *et al.*, 1991 y Cárdenas, 1996) que nos permite comprender como ocurre la relación entre las secreciones de hormonas en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

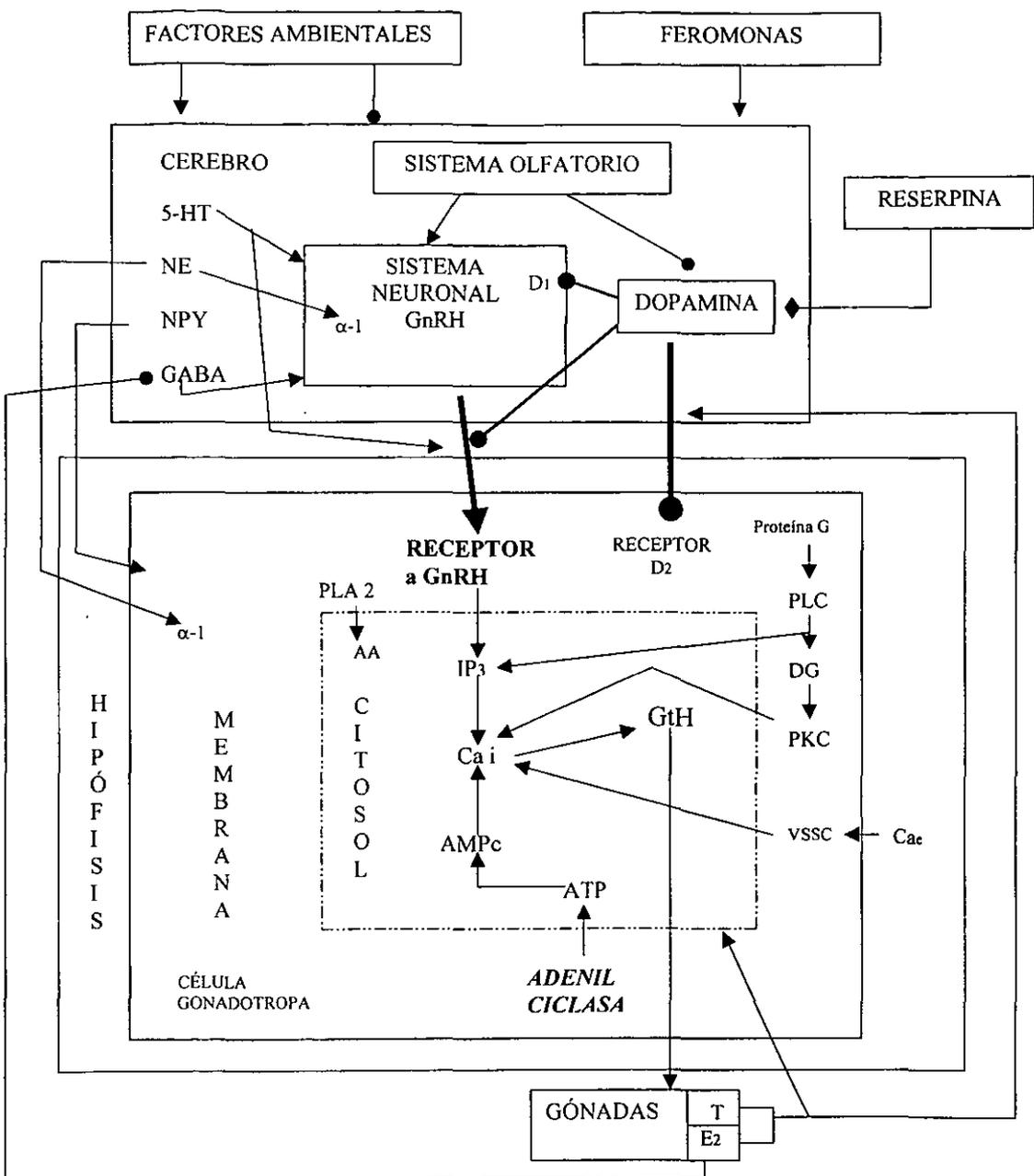


Fig 1. Modelo de la regulación neuroendocrina de la secreción de GtH (Modificado de Peter *et al.*, 1991; Cárdenas, 1996). Se muestran los principales factores estimulantes (línea con flecha) e inhibidores (línea con punto) de la liberación de gonadotropinas en teleósteos

Abreviaciones: GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; Ca<sub>i</sub>, calcio intracelular; ATP, adenosín trifosfato; AMPc, adenosín monofosfato cíclico; PLA<sub>2</sub>, fosfolipasa A<sub>2</sub>; AA, ácido araquidónico; PLC, fosfolipasa C; DG, diacilglicerol; PKC, cinasa C; GtH, hormonas gonadotrópicas; 5-HT, serotonina; NPY, neuropéptido Y; GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico; NE, norepinefrina; T, testosterona; E<sub>2</sub>, estradiol;  $\alpha$ -1 receptor noradrenérgico; D<sub>1</sub>, receptor a D<sub>1</sub>; D<sub>2</sub>, receptor a D<sub>2</sub>.

## I. JUSTIFICACIÓN

La utilización de alimentos para la población humana mundial depende en buena medida de los recursos acuáticos. Es por ello que el hombre ha desarrollado la piscicultura para obtener una mayor producción de crías de los cultivos que se han constituido como una importante fuente de alimento, cubriéndose así la necesidades económicas, culturales y sociales de las cuales depende.

Las técnicas de mantenimiento, crecimiento y reproducción de los peces ha ido cobrando importancia y se ha pasado de técnicas con las cuales se mantenía a las especies y tan sólo se extraía una parte de su población, a otras en las que se aplica el control de los factores ambientales, el manejo del ciclo reproductivo, y más recientemente a la aplicación de sustancias que promueven el crecimiento o la reproducción de la especie. Para ello se han desarrollado métodos de inducción a la maduración y puesta utilizándose antagonistas dopaminérgicos como el pimozide (Chang *et al.*, 1984b; Peter *et al.*, 1987; Sokolowska *et al.*, 1985) o sustancias que depletan la dopamina como la reserpina, las cuales tienen una influencia sobre el sistema neuroendocrino hipotalámico e hipofisiario. Se ha mostrado que con dosis administradas de 1 mg/Kg de peso de reserpina aumenta el volumen de semen en carpas de 2 Kg de peso (Sokolowska *et al.*, 1988). Esta misma dosis, provoca una variación apreciable en el número y volumen de la células gonadotropas (González, 1994), las cuales a su vez promueven la maduración gonadal de peces juveniles machos de 30 a 60g. de peso (García, 1994), ampliándose la posibilidad de utilizar este fármaco como un posible inductor de la reproducción en Ciprinidos.

Por todo lo anterior, este trabajo tuvo como fin el conocer los efectos que produce la dosis de reserpina sobre las células gonadotropas del pez dorado, cuantificando sus variaciones para así contribuir al conocimiento de la cinética de dicho fármaco. Para favorecer una pronta maduración de los peces en cultivo en menor tiempo y una mayor producción de crías, además de ser un fármaco de bajo costo, accesible, inyectado intraperitonealmente y sólo, para utilizarse como un posible inductor de la espermatogénesis e incrementar la cantidad de semen en peces maduros.

## **OBJETIVO**

Cuantificar las variaciones en el número de células gonadotropas del pez dorado (*Carassius auratus*) con diferente número de aplicaciones de reserpina.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

- ❖ Cuantificar el número de células gonadotropas a la segunda, cuarta, sexta y octava aplicación de la reserpina.

## METODOLOGÍA

**Animales.** Se utilizaron machos del pez dorado (*Carassius auratus*) entre 30-60g. de peso aproximadamente, los cuales se mantuvieron bajo condiciones controladas, la temperatura fue constante a  $20^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  y con aereación constante. El fotoperíodo tuvo un régimen de 12 h. de luz y 12h. de oscuridad. Los peces fueron alimentados con alimento comercial balanceado (Warley). Dichas condiciones se mantuvieron durante la realización del experimento.

**Reactivos.** La reserpina (Sigma Chem S8-0346) fue preparada a una concentración de 1mg/ml de vehículo e inyectada intraperitonealmente con la ayuda de una aguja insulínica (Sokolowska *et al.*, 1988).

El vehículo fue preparado a una dilución 9:1 (propilenglicol y dimetilsulfóxido), inyectado intraperitonealmente con la ayuda de una aguja insulínica (J.T Baker y Merck-Schuchardt, respectivamente).

El anticuerpo anti-GtH II de conejo fue proporcionado por el Dr. R. E. Peter, (Universidad de Alberta, Edmonton, Canadá). Anticuerpo anti-IgG de chivo anti conejo, marcado (H+L) (PIERCE). Diaminobenzidina (Sigma)

**Diseño experimental.** Los organismos fueron separados en 3 grupos: grupo control, grupo testigo y grupo experimental, y cada uno dividido a su vez en cuatro subgrupos (2, 4, 6, 8) que correspondieron al número de aplicaciones de la reserpina al subgrupo respectivo. Al grupo control no se le sometió a tratamiento alguno. El grupo testigo fue inyectado con la misma proporción de vehículo que los grupos experimentales y se sacrificaron 48 h. después de la segunda, cuarta, sexta y octava aplicación.

Los grupos experimentales (2, 4, 6, 8) se trataron con 1 mg/Kg de peso de reserpina cada 48h. por medio de inyecciones. Cuarenta y ocho horas después de la segunda, cuarta, sexta y octava inyección se sacrificaron 5 organismos (Sokolowska *et al.*, 1988; González, 1994).

**Preparación del Tejido.** Se removieron las hipófisis y se fijaron en solución amortiguadora de fosfato (PBS) con paraformaldehído al 2 % y picrato en solución acuosa saturada (pH 7.4) (Stefanini *et al.*, 1967). Después se lavaron con PBS se deshidrataron en

alcoholes graduales ascendentes y se incluyeron en Parafina. Se realizaron cortes en un microtomo de rotación (Marca American Optical) a 5  $\mu\text{m}$ , y se realizó el desparafinado en xilol e hidratación de tejidos con alcoholes descendentes para la aplicación de la técnica inmunohistoquímica.

***Inmunohistoquímica.*** Se realizó la técnica inmunohistoquímica (Taylor y Burns, 1974; Elson, 1995), el procedimiento general está descrito en el apéndice I.

En breve, los cortes desparafinados se sumergieron en etanol-ácido por 15 min. para inactivar la peroxidasa endógena. Después de la incubación, se bloquearon los sitios inespecíficos con suero Bovino 1% en PBS a temperatura ambiente por 30 min., se incubó el primer anticuerpo anti-GtH II de conejo (1:25) por 24 h a 4° C. Posteriormente, se colocó un segundo anticuerpo anti-IgG de chivo anti conejo conjugado con peroxidasa por 2 h. y se reveló con una solución de diaminobenzidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% contratiñéndose con Hematoxilina de Mayer. Los cortes se montaron con resina.

La especificidad del ensayo se confirmó con la elaboración de controles: (1) sin bloquear y con segundo anticuerpo, (2) bloqueando con suero y segundo anticuerpo, (3) inactivando peroxidasa endógena y revelando con sustrato, (4) sin inactivar peroxidasa y revelar con sustrato.

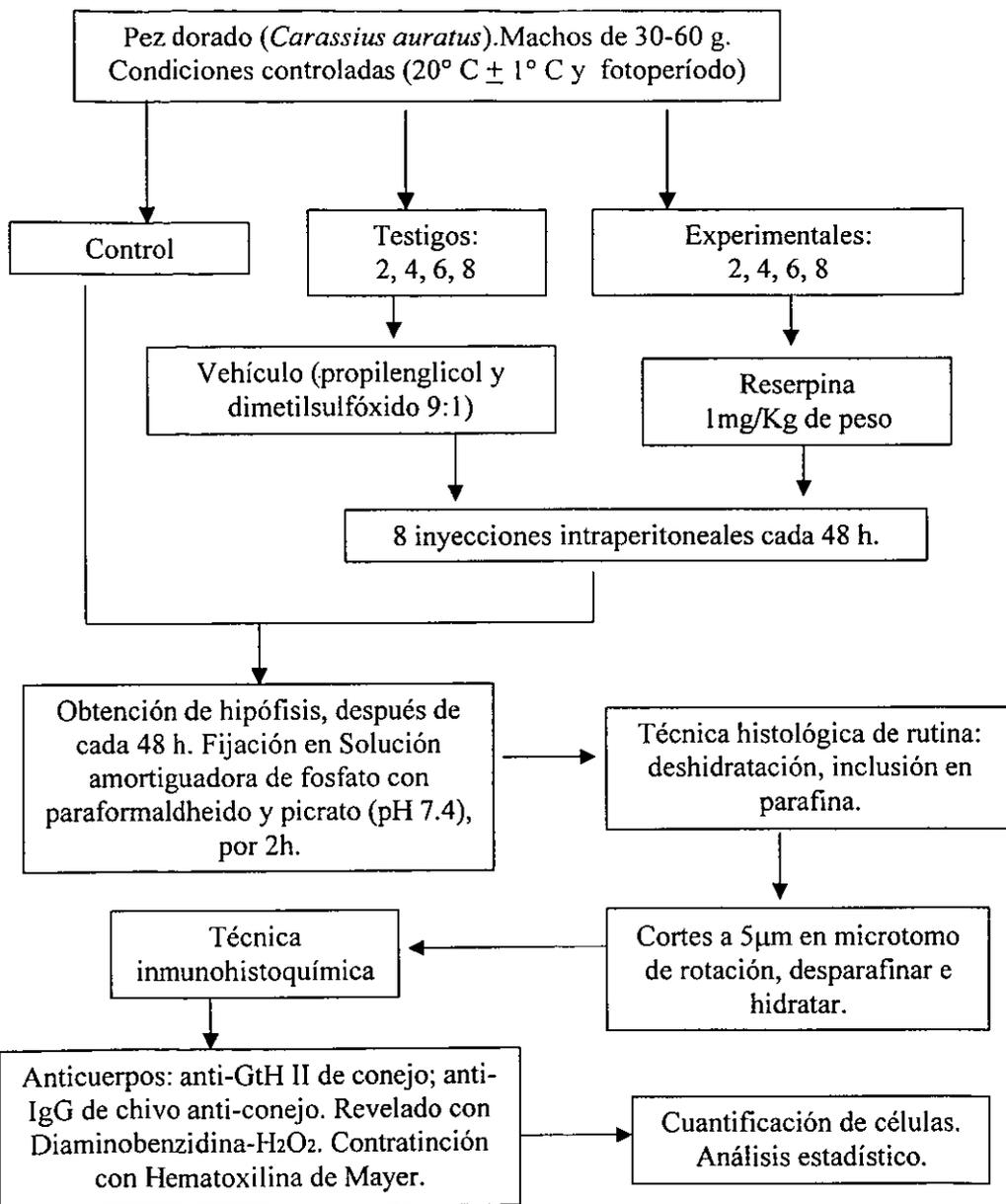
***Conteo y análisis estadístico.*** Se realizó el conteo del número de células gonadotropas bajo el uso del analizador de imágenes, Image Pro-Plus, versión 4.0. Considerando que el tamaño de las células gonadotropas miden aproximadamente  $25 \pm 5$  micrómetros, el conteo se realizó cada 5 cortes, con el propósito de que las células contadas no fuesen las mismas.

Los resultados se obtuvieron como el número total de células gonadotropas por hipófisis, expresándose como el valor promedio para cada grupo y aplicación correspondiente.

Los resultados de los valores promedio se expresaron en porcentaje, tomándose la media del grupo control como el 100 %.

Se utilizó el programa Statistica-SAS para windows versión 4.5 para el análisis estadístico de los resultados, aplicándose el estadístico de ANOVA y la prueba de Tukey HSD con el fin de establecer diferencias entre el número de aplicaciones de la reserpina y entre grupos control, testigo y experimental.

# METODOLOGÍA



## RESULTADOS

El empleo de fármacos antidopaminérgicos han mostrado ser efectivos para la estimulación de la espermatogénesis en diversas especies de teleósteos. Tal es el caso de la reserpina, la cual depleta los depósitos de catecolaminas como la dopamina permitiendo la liberación de las células gonadotropas.

Empleando la reserpina en el presente trabajo para cuantificar las variaciones en la cantidad de células gonadotropas del pez dorado con diferente número de aplicaciones del fármaco.

En el número de células gonadotropas contadas por hipófisis para los diferentes grupos y su respectiva aplicación (Tabla 1), se observa un incremento en los grupos experimentales con respecto a los otros grupos. En el grupo control la media es de  $415 \pm 38.53$ . Los grupos testigo, una media de  $411 \pm 18.17$  para la segunda aplicación hasta  $455 \pm 12.02$  para la sexta aplicación, presentando una media total de  $434 \pm 23.38$ .

Los grupos experimentales tienen medias de  $1200 \pm 48.36$ ,  $1387 \pm 39.92$ ,  $1491 \pm 46.83$ ,  $1610 \pm 75.09$ , para cada aplicación correspondiente. Observándose que, tanto el grupo control como los testigos no presentan diferencia significativa alguna ( $p \geq 0.05$ ).

Observando los datos obtenidos para la segunda aplicación (gráfica 1) se ve que el valor promedio del grupo control (100%, Fig. 1A) y testigo (99%, Fig. 1B) no presentan diferencia alguna ( $p \geq 0.05$ ), y al ser comparados con el grupo experimental, éste presenta una diferencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) para el 289 % de células percibiéndose esto en el corte de la Fig. 1C.

Los valores promedio del número de células gonadotropas de la cuarta aplicación (gráfica 2) no presentan diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre el grupo control (100%, Fig. 1A) y testigo (107%, Fig. B), pero al compararse con el grupo experimental, éste presenta una diferencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ , Fig. 1D) correspondiente al 334% de células gonadotropas.

Los datos obtenidos de la sexta aplicación (gráfica 3), muestran los valores promedio del número de células gonadotropas sin diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre el grupo control (100%, Fig. 1A) y testigo (109%, Fig. 1B), pero el grupo experimental presentan una diferencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ , Fig. 1E) y un 359 % de células en comparación con el grupo control y testigo.

En la octava aplicación (gráfica 4) los valores promedio del número de células correspondientes al grupo control (100%, Fig. 1A) y testigo (105%, Fig. 1B) no tienen diferencia significativa alguna ( $p \geq 0.05$ ), pero el grupo experimental presenta una diferencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ), lo cual es visible en el corte de la Fig. 1F, con un 388% de células.

De acuerdo a la gráfica (5), se puede ver que los valores promedio del grupo control y del grupo testigo total, que corresponden respectivamente a la media de los subgrupos, presentan un valor de 105 % para el grupo testigo con respecto al 100 % del grupo control, no teniendo una diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ). Pudiéndose ver que entre el grupo control y testigo (Fig. 1A y 1B) hay una similitud en cuanto al número de células, por lo que nos dice que el vehículo aplicado en los subgrupos testigo no interfiere en el tratamiento aplicado a los experimentales, por lo que la respuesta obtenida en los experimentales es atribuida a la reserpina aplicada. Pero el grupo experimental presenta una diferencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) al compararse con ambos grupos.

Además, al comparar los resultados de los valores promedio del número de células gonadotropas (gráfica 5) de los grupos experimentales 2 (289 %), 4 (334 %), 6 (359 %) y 8 (388 %) se observan diferencias significativas entre ellos ( $p < 0.05$ ). El grupo experimental 2 (Fig. 1C) presenta una diferencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo experimental 4 (Fig. 1D), 6 (Fig. 1E) y 8 (Fig. 1F). El grupo experimental 4 (Fig. 1D) presenta una diferencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo experimental 6 y 8 (Fig. 1E y 1F, respectivamente). El grupo experimental 6 (Fig. 1E) presenta diferencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo experimental

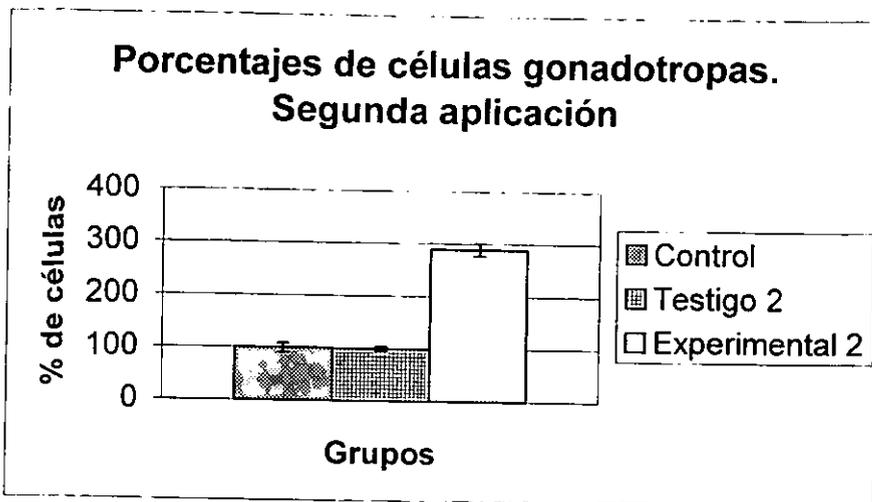
8 (Fig. 1F). Por lo que se obtiene un número de células que incrementan de una manera progresiva.

No obstante, al compararse cada aplicación con respecto al tiempo, con la prueba de Tukey HSD, nos muestra que la segunda aplicación presenta una diferencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) con respecto a la cuarta, sexta y octava aplicación respectivamente. Pero al comparar la cuarta aplicación con la sexta y octava aplicación, no hay diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ). Y al comparar la sexta aplicación con la octava, tampoco se observa diferencia significativa alguna ( $p \geq 0.05$ ). Lo cual nos indica que no hay diferencia alguna ( $p \geq 0.05$ ) entre ellas, por lo que una segunda aplicación bastaría para incrementar el número de células gonadotropas en la hipófisis del pez dorado.

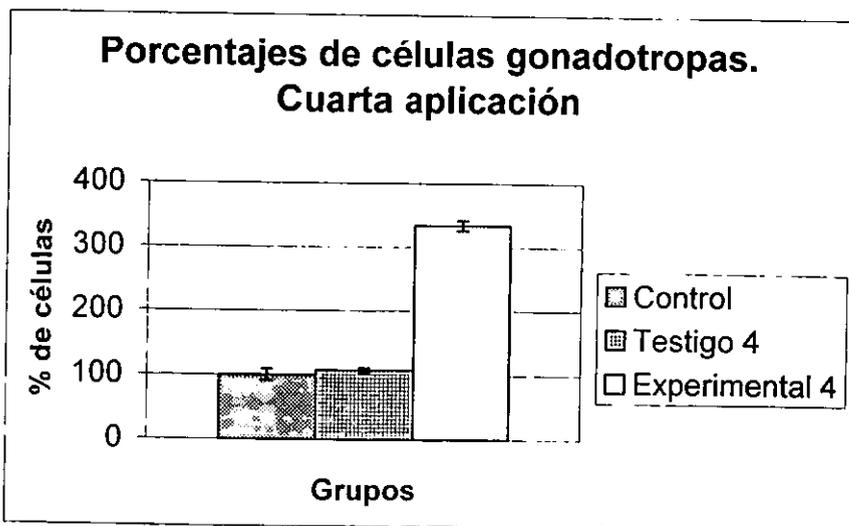
Al revisar los cortes, en las observaciones de hipófisis se pudo apreciar que la mayoría de las células gonadotropas de los 3 grupos se encontraban localizadas en la pars distalis y en forma escasa en la pars intermedia y rostralis de la adenohipófisis. Encontrando que las células se localizan a la periferia de la hipófisis en el caso de todos los grupos (Fig. 1A-F), aunque si hay presencia de éstas en el centro pero en menor número.

		CONTROL		TESTIGO (Total)	
		MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR
		415	38.53	434	23.38
GRUPO INY.	TESTIGOS		EXPERIMENTALES		
	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR	
SEGUNDA	411	18.17	1200	48.36	
CUARTA	445	15.82	1387	39.92	
SEXTA	455	12.02	1491	46.83	
OCTAVA	434	25.13	1610	75.09	

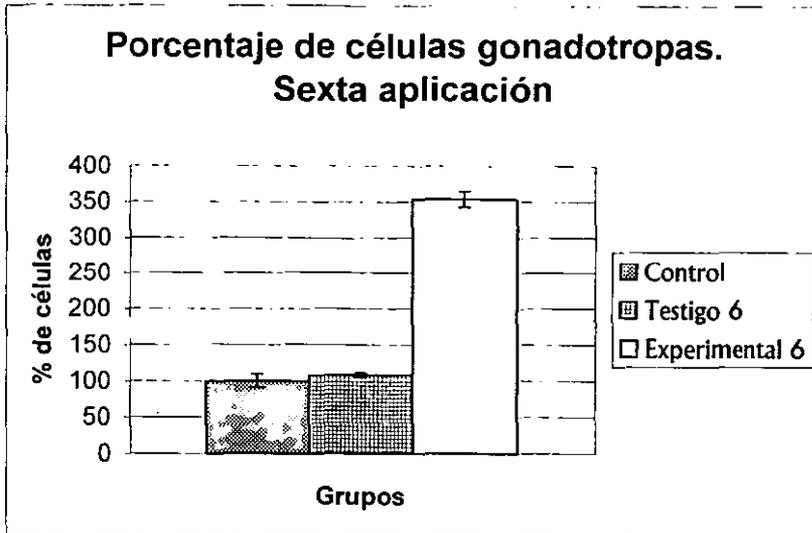
TABLA 1. Desviaciones estandar y medias, del número de células gonadotropas por hipófisis observado, de cada grupo de acuerdo a la inyección o aplicación respectiva. Abreviaturas: INY., inyecciones o aplicaciones.



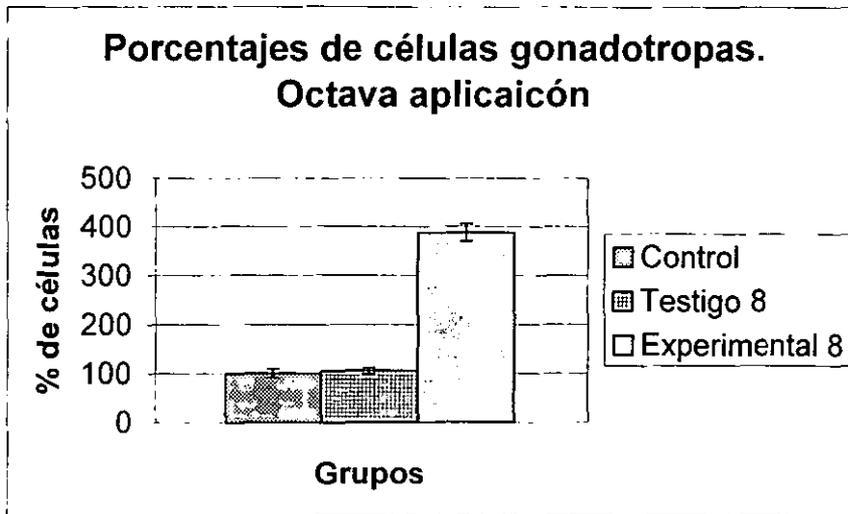
Gráfica 1. Porcentajes de células gonadotropas correspondiente a cada grupo. Observándose que no hay diferencia ( $p \geq 0.05$ ) entre grupo control y testigo. El grupo experimental de segunda aplicación presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación a los otros grupos.



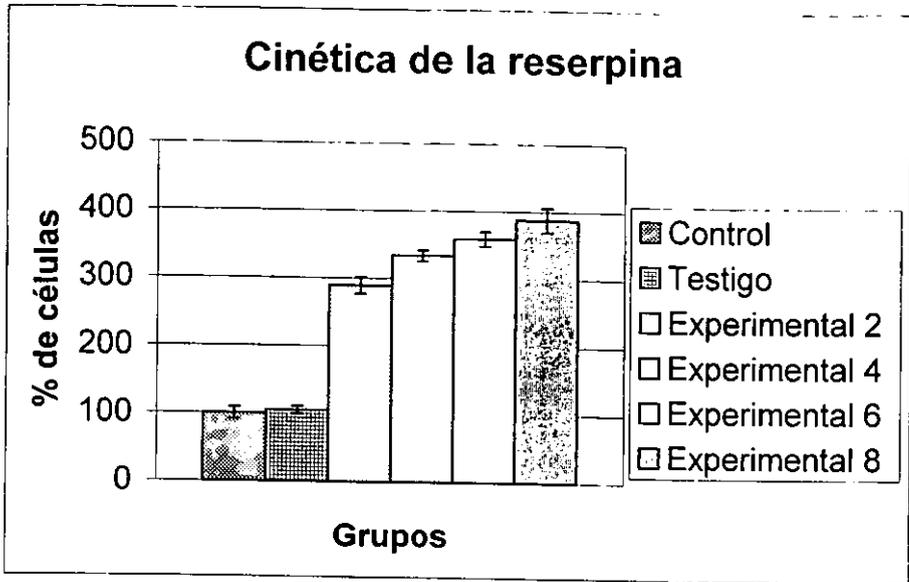
Gráfica 2. Porcentajes de células gonadotropas correspondiente a cada grupo. Observándose que no hay diferencia ( $p \geq 0.05$ ) entre grupo control y testigo. Grupo experimental de cuarta aplicación con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación a los otros grupos.



Gráfica 3. Porcentajes de células gonadotropas correspondiente a cada grupo. Observándose que no hay diferencia ( $p \geq 0.05$ ) entre grupo control y testigo. Grupo experimental de sexta aplicación con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación a los otros grupos.



Gráfica 4. Porcentajes de células gonadotropas correspondiente a cada grupo. Observándose que no hay diferencia ( $p \geq 0.05$ ) entre grupo control y testigo. El grupo experimental de octava aplicación con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación a los otros grupos.



Gráfica 5. Porcentajes de células gonadotropas correspondiente a cada grupo. Observándose que no hay diferencia ( $p \geq 0.05$ ) entre grupo control y testigo. El grupo experimental presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación a los grupos control y testigo. Comparándose entre ellos a los experimentales se ve que hay diferencias significativas entre ellos ( $p < 0.05$ ), mostrándose una curva dependiente del tiempo.

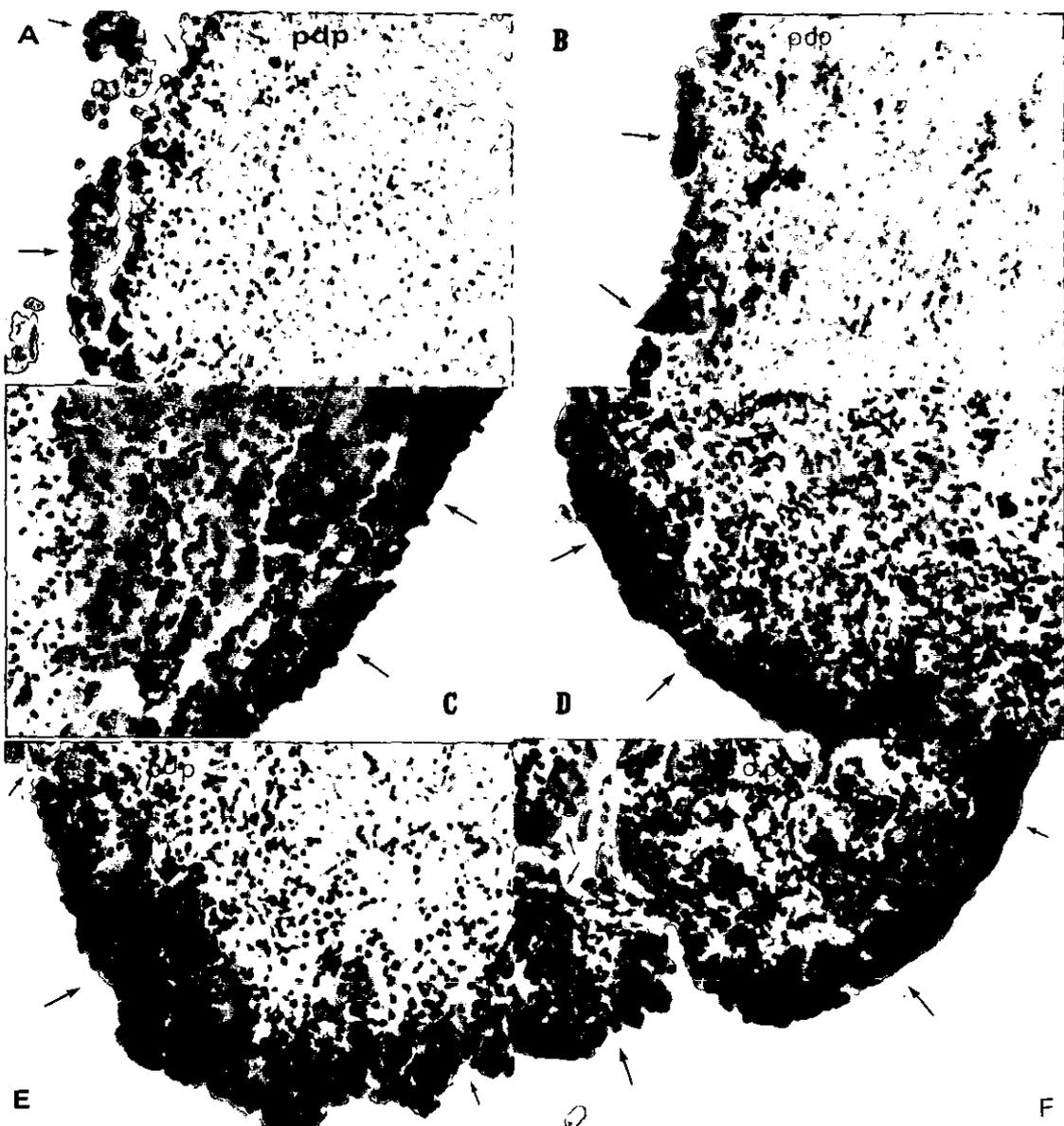


Fig. 1a-f. Efecto de la reserpina en el número de células gonadotropas en la hipófisis del pez dorado (*Carassius auratus*) causando un aumento en el número de células en los organismos inyectados con dicho fármaco. Se aprecia en los cortes transversales de hipófisis, que el aumento en el número de células gonadotropas de la segunda (C) 200X, cuarta (D) 200X, sexta (E) 200X y octava (F) 200X aplicaciones es mayor ( $p < 0.05$ ) que el del control (A) 200X y testigo (B) 200X. Se observa que (A) y (B) no presentan diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) y al comparar los cortes de los experimentales entre ellos (C, D, E, F) presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Contraintinación de Hematoxilina de Mayer.

## DISCUSIÓN

Diversos autores reportan altos niveles de GtH en suero durante todo el ciclo reproductivo de salmónidos (Suzuki *et al.*, 1987, 1988; Swanson *et al.*, 1987; Amano *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1993; Kagawa *et al.*, 1998b), sin embargo, estudios con pez dorado muestran altas concentraciones de GtH en hipófisis y en plasma de hembras maduras o en recrudescencia tardía (Cook y Peter, 1980), durante la vitelogénesis y en la ovulación (Kobayashi *et al.*, 1988), y un incremento en RNAm para GtH-I $\beta$  y GtH-II $\beta$  durante el desarrollo gonadal (Yoshiura *et al.*, 1997). Estos reportes son datos cuantitativos, que nos hablan sobre los posibles papeles que tienen las gonadotropinas en los peces teleósteos, aunque no puedan ser contrastados con nuestros resultados. No obstante, es necesaria la cuantificación de células gonadotropas para así poder conocer el efecto que la reserpina ejerce sobre el número de las células gonadotropas (GtH-II), efecto que fue evaluado en el presente estudio.

El incremento en el número de células al comparar los resultados entre los subgrupos control y testigo con los grupos experimentales, fue observado 48 horas después de cada aplicación (gráficas 1, 2, 3 y 4), lo que nos indica que la reserpina provoca un aumento de más de 2 veces hasta casi 4 veces más de células gonadotropas, en comparación con el control, sobre el número de las células a la dosis de 1 mg/Kg de peso en peces sexualmente maduros de 30-60 g de peso. Esto se relaciona con los datos reportados por Sokolowska *et al.*, (1988), quien mostró que la reserpina sola, favorece la espermiación a dosis de 1 mg/Kg de peso en carpas maduras, con un aumento de 2.5 ml/kg en el volumen de esperma y de 20 ng/ml en la concentración de gonadotropinas en el suero, lo cual comienza a disminuir después de 48 h. de su aplicación. También, estudios realizados con la reserpina a la misma dosis reportan un aumento de más de 7 en el número de células gonadotropas (González, 1994), y un incremento en el número de cistos de espermatoцитos secundarios en el testículo de juveniles de capa común, sugiriéndose así, la posibilidad de presentarse un efecto positivo del fármaco en la espermatogénesis (García, 1994). Sin embargo, en hembras juveniles de esta especie, la dosis de 1 mg/Kg de peso no presentó un efecto

similar al ocurrido en machos, debido a que, el tiempo en que ocurre la gametogénesis es mayor, requiriéndose tal vez, una mayor dosis (Ceballos, 1996).

Cabe mencionar que en cuanto a los resultados observados entre el grupo control y testigos (Gráfica 1, 2, 3 y 4), sin diferencia significativa alguna ( $p \geq 0.05$ ), con un número promedio total de 415 células para el grupo control y 434 células para el grupo testigo (gráfica 5), sin diferencia significativa alguna ( $p \geq 0.05$ ) nos indican que ni el vehículo aplicado, ni la manipulación en este subgrupo tiene efecto, comparado con el tratamiento aplicado a los experimentales, por lo que el aumento en los experimentales debe ser atribuido a la reserpina aplicada.

Nuestros resultados sobre el incremento en el número de células gonadotropas (GtH-II), en el grupo experimental (gráfica 4) fue casi 4 veces mayor que el grupo control después de la 8ª aplicación, siendo ello similar a lo que observó González (1994), quien reportó un incremento en el número de células gonadotropas de más de 7 veces, con respecto al control, en la octava aplicación bajo condiciones parecidas, utilizando carpas juveniles (*Cyprinus carpio*) machos, de aproximadamente 190 g. de peso, sexualmente inmaduras, identificando a las células gonadotropas por medio de la técnica histológica de Jafri (1979), es decir, que posiblemente observó células gonadotropas en general, sin distinción alguna en cuanto al tipo de gonadotropina que reaccionó. En el presente trabajo se hizo uso de una técnica inmunohistoquímica (Taylor y Burns, 1974, y Elson, 1995) que nos permitió identificar, con una mayor especificidad en comparación con la técnica histológica, a las células aplicando un anticuerpo específico a GtH-II (anti-GtH-II), por lo que el número observado, corresponde a células productoras de gonadotropina maduracional o GtH-II. Esa diferencia que pudiera explicar las variaciones porcentuales para peces en etapa de madurez sexual de 30-60 g. de peso, los cuales ya presentan un cierto número de células gonadotropas activas en comparación a peces inmaduros, y sólo se observan las diferencias en el número de células con respecto a los controles manejados, estableciéndose que la reserpina es un fármaco que ocasiona un incremento evidente en el número de células gonadotropas en la hipófisis del pez dorado (*Carassius auratus*) en etapa de madurez y que puede servir como un posible inductor de la espermatogénesis.

Además, al observar la cinética de la reserpina (gráfica 5), nos indica un incremento paulatino en el aumento de células gonadotropas, lo cual es debido a la respuesta que éstas presentan a través de los tiempos ante la aplicación del fármaco. Los resultados obtenidos, establecen un aumento considerable de más de 2 a casi 4 veces más en el número de células gonadotropas en la hipófisis del pez dorado en los grupos experimentales, señalándonos que la aplicación de la reserpina posiblemente induce una mayor liberación de gonadotropinas en machos sexualmente maduros como consecuencia de la depleción de la DA desde las primeras aplicaciones, ya que estudios realizados con sustancias que afectan la presencia de DA como la reserpina, muestran un aumento en la cantidad de semen y concentración de gonadotropinas en suero de carpas maduras (Sokolowska *et al.*, 1988).

Esto también queda corroborado por el uso de antagonistas específicos para receptores D<sub>2</sub>, como el pimozide, pues al aplicarlo a hembras de pez dorado sexualmente maduras o en recrudescencia, aumentaron la concentración de GtHs y elevan los efectos de análogos de la sGnRH y LHRH a 12° C (Chang *et al.*, 1984b) y a 20° C (Sokolowska *et al.*, 1985). Confirmándose así que la presencia de estos tipos de fármacos en el pez dorado incrementa la secreción de GtH proveniente de las células gonadotropas.

La acción directa reportada para la DA en la hipófisis, es inhibiendo la estimulación de la GnRH en la liberación de gonadotropinas como lo observó Chang *et al.*, (1984a) y Peter *et al.*, (1986) en células dispersas de fragmentos hipofisarios de pez dorado, así como, inhibiendo la secreción espontánea de GtH. En otro experimento, Chang *et al.* (1983) reporta que en hembras de pez dorado bajo el uso de agonistas como la apomorfina disminuyen los niveles plasmáticos de GtH y al aplicar pimozide, se previno el decremento ocasionado por la apomorfina, indicando así que la DA tiene actividad inhibitoria de la liberación de GtH directamente en células gonadotropas y bloquea las acciones de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El mecanismo inhibitor de la liberación es a través del receptor D<sub>2</sub> (Omeljaniuk *et al.*, 1987; Peter *et al.*, 1991) y la vía seguida es mediante la disminución de los niveles de AMPc, PKC y Ca<sup>++</sup>i, los cuales intervienen en la secreción de GtHs (Chang *et al.*, 1993); no existen trabajos previos que indiquen si la DA tiene además de sus efectos sobre la secreción de GtH-II, impacto sobre la síntesis de la GtH, por lo cual, otra posibilidad, es que, al liberarse la célula gonadotropa de la influencia

de la DA, se incrementa la síntesis de GtH, favoreciendo así, una mayor cantidad de la hormona para su liberación. Sin embargo, se requiere de experimentos específicos para demostrar esta hipótesis.

En peces no se ha realizado reporte alguno sobre la cinética de la reserpina en relación con las células gonadotropas, y los trabajos realizados abarcan la distribución de las células gonadotropas en hipófisis, sin haberlas cuantificado. Con excepción del trabajo de González, (1994), el cual se basó en la cuantificación de células gonadotropas a la octava aplicación bajo el uso de técnicas de tinción diferencial no se cuenta con un trabajo previo. Es por ello, que el presente trabajo contribuye al conocimiento de los efectos de la reserpina a diferentes aplicaciones para así conocer su cinética como una curva dependiente del tiempo de aplicaciones. Obteniéndose un incremento en el número de células de más de 2 veces (289 %), desde la segunda aplicación, pudiéndose tomar como alternativa hasta la aplicación de una octava inyección con un aumento de casi 4 veces (388 %) el número de células con respecto al grupo control. Sin embargo con una segunda aplicación podría bastar para que el número de células se vea incrementado en un 289 %, sin necesidad de aplicar hasta la octava inyección, esto pudiera tener utilidad en la acuicultura debido a que es un fármaco accesible y que por medio de inyecciones intraperitoneales es posible inducir la espermatogénesis y en consecuencia incrementar la cantidad de semen en peces maduros.

La detección de las células gonadotropas se ha realizado de diversas maneras con el fin de localizarlas e identificarlas bajo el uso de técnicas de tinción diferencial en la hipófisis de la carpa común (*Cyprinus carpio*) (González, 1994) y en el atún aleta azul (*Bluefin tuna*) (Kagawa *et al.*, 1998); pero en la actualidad el empleo de técnicas que aumentan la especificidad como las inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, se han utilizado en hipófisis de diversos grupos como en peces (Kagawa *et al.*, 1998b; Olivereau *et al.*, 1983), anfibios (Pearson *et al.*, 1998), reptiles (Naik *et al.*, 1980; Batista *et al.*, 1989; Mohanty *et al.*, 1997b) y aves (Mohanty *et al.*, 1997a) con el fin de identificar y observar la distribución de las células hipofisarias, siendo únicamente cualitativos. Cabe mencionar que el empleo de las técnicas inmunocitoquímicas han permitido asociar a cada uno de los tipos celulares con la hormona que la secreta (Cambre *et al.*, 1986).

La técnica inmunocitoquímica es en la actualidad una de las herramientas más importantes en la identificación de las células gonadotropas, sin embargo, existe la posibilidad de estudiar a las células relacionando las técnicas histológicas e inmunocitoquímicas, obteniendo así una técnica inmunohistoquímica práctica, económica, confiable y que se realice en menor tiempo. Es por ello que, los resultados de las observaciones microscópicas en la hipófisis del pez dorado (*Carassius auratus*) en el presente trabajo nos indican que mediante la técnica inmunohistoquímica empleada, es posible la detección de las células gonadotropas productoras de GtH-II presentes en los diferentes grupos. Siendo la primera vez en que se utiliza una técnica como ésta para la identificación de las células en hipófisis de pez y sobretodo para estudios cuantitativos.

La localización de las células gonadotropas se encontró principalmente en la PDP, y escasamente en la PI, coincidiendo con lo reportado en peces por González, (1994), Kagawa *et al.*, (1998b) y Olivereau *et al.*, (1883), y en otros vertebrados (anfibios, (Pearson *et al.*, 1998), reptiles (Naik *et al.*, 1980; Batista *et al.*, 1989; Mohanty *et al.*, 1997b) y aves (Mohanty *et al.*, 1997a)). Así como, la presencia de las células a la periferia de la hipófisis observada en los tres grupos es similar a la localización de células GtH-II a lo largo del borde externo de la PI y en la parte central de la PDP, observado por Kagawa *et al.*, (1998) en la hipófisis del atún de aleta azul. Sin embargo, las técnicas empleadas en estos estudios son análogas entre sí, ya que utilizan técnicas de tinción diferencial, inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas que difieren en cuanto a lo que emplean (colorantes o anticuerpos) y los tiempos en los que se realizan, pero poseen un mismo fin cualitativo, el de identificar y conocer la distribución de los diferentes tipos celulares adenohipofisarios. Al ser comparadas con la técnica utilizada en el presente trabajo, se recomienda ocupar dicha técnica como una alternativa práctica, rápida y confiable, ya que posee una mayor especificidad en comparación con la tinción diferencial, y solo se hace uso de dos anticuerpos, en comparación con las otras dos técnicas que usan además de dos anticuerpos, un complejo peroxidado o biotilado como la avidina-biotina, recurriendo así a más recursos y aplicar un tiempo mayor.

## CONCLUSIONES

- ❖ La reserpina es un fármaco que, por medio de inyecciones intraperitoneales, ocasiona un incremento evidente en el número de células gonadotropas en la hipófisis del pez dorado (*Carassius auratus*) en etapa de madurez.
- ❖ La dosis de 1 mg /Kg de peso de reserpina induce un aumento en el número de células gonadotropas desde su segunda aplicación en peces sexualmente maduros.
- ❖ El número de células gonadotropas aumenta un 289 % después de la segunda aplicación, hasta un 388 % en la octava aplicación, por lo que el efecto de la reserpina es dependiente del número de aplicaciones del fármaco.

## APÉNDICE I

### Técnica inmunohistoquímica (Taylor y Burns, 1974; Elson, 1995).

1. Permeabilizar los cortes en metanol a 4° C por 5 minutos.
2. Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena presente en la células, se colocan en una cámara húmeda las laminillas durante 15 minutos con etanol-ácido (0.074 % HCL en etanol al 100 %) (Weir *et al.*, 1974).
3. Lavar 4 veces con Buffer de Fosfatos Salino (PBS) (1:3).
4. Incubar en suero Bovino 1%-PBS 1x a temperatura ambiente por 30 minutos.
5. Incubar con el primer anticuerpo anti-GtH II de conejo (1:25) por 24 h. A 4 °C.
6. Lavar 2 veces con PBS 1:3.
7. Incubar con el segundo anticuerpo conjugado de peroxidasa anti-IgG de chivo anticonejo por 2 h.
8. Lavar 2 veces con PBS 1:3.
9. Revelar con una solución sustrato de diaminobenzidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % por 5 minutos aproximadamente o hasta que se genere color. Detener la reacción en PBS 1:3 y realizar 4 lavados.
10. Se contratiñe con Hematoxilina de Mayer por 1-3 minutos.
11. Lavar con agua corriente.
12. Deshidratar con alcoholes graduales (alcohol del 70°, 90°, 96° y absoluto) por 1 min. y aclarar en xilol por 3 min.
13. Finalmente montar con resina y observar al microscopio.

## BIBLIOGRAFÍA

Amano, M., Aida, K., Okumoto, N. Y., y Hasegawa, Y. 1992. Changes in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in the brain and pituitary, and GTH contents in the pituitary in female masu salmon, *Oncorhynchus masou*, from hatching through ovulation. *Zool. Sci.* 9:357-386.

Amano, M., Hyodo, S., Kitamura, S., Ikuta, K., Suzuki, y., Urano, A., y Aida, K. 1995. Salmon GnRH synthesis in the preoptic area and the ventral telencephalon is activated during gonadal maturation in female masu salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99:22-27.

Amano, M., Urano, A., y Aida, K. 1997. Distribution and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the teleost brain. *Zool. Sci.* 14:1-11

Batista, M.A.P., Doerr-Schott, J., y Bello, A.R. 1989. Immunohistochemical study on the development of the adenohypophysial cells in the lizard *Gallotia galloti*. *Anat. Embryol.* 28:513-529.

Bello, P.J. 1993. Respuesta secretora a la hormona liberadora de gonadotropinas por la hipófisis anterior aislada de ratas macho durante el desarrollo postnatal: de la etapa infantil a la adulta. Tesis de Licenciatura. ENEP-I, UNAM.

Billard, R., Alagarwami, K., Peter, R.E., y Breton, B. 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)* 296:181-184.

Bogerd, J., Li, K.W., Janssen-dommerholt, C., y Goos, H. 1992. Two gonadotropin releasing hormones from African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:127-134.

Bond, C.T., Francis, R.C., Fernald, R.D., y Adelman, J.P. 1991. Characterization of complementary DNA encoding the precursor for gonadotropin-releasing hormone and its associated peptide from a teleost fish. *Mol. Endocrinol.* 5:931-937.

Breton, B., Govoroun, M., y Mikolajczyk, T. 1998. GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: Relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 111:38-50.

Cárdenas, R.R. 1996. Regulación endócrina de la reproducción y el crecimiento en peces óseos. *Ciencia y Desarrollo*. pg. 22-28.

Cavaco, J.E.B., Vilroix, C., Trudeau, V.L., Schulz, R.W., y Goos, H.J. Th. 1998. Sex steroids and the initiation of puberty in male African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Am. J. Physiol.* 275:793-802.

Ceballos Orozco Rosa Gabriela. 1996. Efectos de la reserpina sobre la ovogénesis de la carpa común, *Cyprinus carpio*. Tesis de Licenciatura. ENEP-I, UNAM.

Cerdá, J., Zanuy, S., y Carrillo, M. 1997. Evidence for dietary effects on plasma levels of sexual steroids during spermatogenesis in the sea bass. *Aquacult. Int.* 5:473-477.

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., Peter, R.E., y Crim, L.M. 1984a. Effects of dopamine and apomorphine on gonadotropin release from the transplanted pars distalis in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55:347-350.

Chang, J.P., y Peter, R.E. 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., Cook, H., Wiggs, A.J., Somoza, G.M. De Leeuw, R., y Peter, R.E. 1990. Use of a pituitary dispersion method and primary culture system for the studies of gonadotropin-releasing hormone action in the goldfish, *Carassius auratus*. I. Initial morphological, static, and cell column perfusion studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77:256-273.

Chang, J.P. Jobin, R.M., y Wong, A.O. 1993. Intracellular mechanisms mediating gonadotropin and growth hormone release in the goldfish, *Carassius auratus*. *Fish. Physiol. Biochem.* 11:25-33.

Chang J.P., y Peter R. 1984. Influences of norepinephrine and  $\alpha$ -adrenergic mechanisms on gonadotropin secretion in female goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55:89-95.

Coe, I.R, von Schalburg, K.R., y Sherwood, N.M. 1995. Characterization of the Pacific salmon gonadotropin-releasing hormone gene, copy number and transcription start site. *Mol. Cell. Endocrinol.* 115:113-122.

Cook, H., Berkenbosch, J.W., Fernhout, M.J., Yu, K.L., Peter, R.E., Chang, J.P., y 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.

Cook, A.F., y Peter, R.E. 1980. Plasma clearance of gonadotropin in goldfish, *Carassius auratus*, during the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 42:76-90.

Davies, B., Bromage, N., y Swanson, P. 1999. The brain-pituitary-gonadal axis of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effects of photoperiod manipulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115:155-266.

Drill, V.A. 1978. Farmacología médica. 2da. Edición. Edit. La Prensa Mexicana. México. pp. 475-481.

Dulka, J.G., Stacey, N.E., Swanson, P., y Van Der Kraak, G.J. 1987. A sex steroid pheromone synchronizes male-female spawning readiness in the goldfish. *Nature*. 325:251-253.

Eckert, R. Randall, D., y Agustine, G. 1990. Fisiología Animal: Mecanismos y adaptaciones. 3ra. Edición. Edit. Interamericana McGraw-Hill. México. pp.293-298.

Elson, C.O., Holland, S.P., Dertzbaungh, M.T., Cuff, C.F., y Anderson, A.O. 1995. Morphologic and functional alterations of mucosal T cells by cholera toxin and Hs B subunit I. *The Journal of immunology*. 154:1032-1040.

Espinosa, M.J., y Labarta, V. 1986. Reproducción en acuicultura. Comisión asesora de investigación científica y técnica. Madrid, España. pp. 5-28.

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

Gómez, J.M., Weil, C., Illitault, M., Le Bail, P.Y., Breton, B., y Le Gac, F. 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 113:413-428.

González, S.L. 1994. Valoración histológica del efecto de la reserpina sobre las células gonadotropas de carpa común (*Cyprinus carpio*). Tesis de Licenciatura. ENEP-I, UNAM. p.63.

Gothilf, Y., Elizur, A., Powell, J.F.F., Sherwood, M.N., y Zohar, Y. 1995. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in gilthead seabream and striped bass: Physiological and molecular studies. En: *Reproductive physiology of fish*, 5<sup>th</sup> International Symposium, 1995, Austin, Texas, p. 31.

- Grober, M.S., Myer, T.R., Marchaterre, M.A., Bass, A.H., y Myers, D.A. 1995. Structure, localization and molecular phylogeny of a GnRH cDNA from a Paracanthopterygian fish, the plainfin midshipman (*Porichthys notatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 99:85-99.
- Habibi, H.R., Van der Kraak, G., Bulanski, E., y Peter R.E. 1988. Effects of teleost GnRH on reinitiation of oocyte meiosis in goldfish *in vitro*. *Am. J. Physiol.* 255:R268-R273.
- Habibi, H.R., Van der Kraak, G., Fraser, R., y Peter R.E. 1989a. Effect of a teleost GnRH analog on steroidogenesis by the follicle enclosed goldfish oocytes *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76:95-105.
- Habibi, H.R., Marchant, C.S., Nahorniak, H., Van Der Loo, Peter, R.E., River, J.E., y Vale, W.W. 1989b. 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. 1991. Homologous desensitization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors in the goldfish pituitary: Effects of native GnRH peptides and a synthetic GnRH antagonist. *Biol. Reprod.* 44:275-283.
- Holland, M.C., Gothilf, Y., Meiri, I., King, J.A., Okuzawa, K., Elizur, A., y Zohar, Y. 1998. Levels of the native forms of GnRH in the pituitary of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, at several stages of the gonadal cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112:394-405.
- Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., y Kobayashi, M. 1998a. GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112:80-88.
- Kagawa, H., Kawazoe, I., Tanaka, H., y Koichi, O. 1998b. Immunocytochemical identification of two distinct gonadotropic cells (GtH I and GtH II) in the pituitary of blufin tuna, *Thunnus thynnus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110:11-18.

Kah, O., Pontent, A., Danger, J.M., Dubourg, P., Vaudry, H., 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., Anglade, Y., Lepretre, E., Dubourg, P., y Monbrison, D. 1993. The reproductive brain in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 11:65-98.

Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Yoshitaka, N., Nozaki, M., Nakai, Y., e Itoh, S. 1989. The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 7: 29-38.

Kim, M.H., Oka,, Y., Amano, M., Kobayashi, M., Okuzawa, K., Hasegawa, Y., Kawashima, S., Suzuki, Y., y Aida, K. 1995. Immunocytochemical localization of sGnRH and cGnRH-II in the brain of goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.* 356:72-82.

Klunglan, H., Lorens, J.B., Andersen, O., Kisen, G.O., y Alestrom, P. 1992. The Atlantic salmon prepro-gonadotropin-releasing hormone gene and mRNA. *Mol. Cell. Endocrinol.* 84:167-174.

Kobayashi, M., Amano, M., Kim, M.H., Yoshiura, Y., Sonh, H., Suetake, H., y Aida, K. 1997. Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. *Fish Physiol. Biochem.* 17:1-8.

Kobayashi, M., Amano, M., Kim, M.H., Furukawa, K., Hasegawa, Y., y Aida, K. 1994. Gonadotropin-releasing hormones of terminal nerve origin are not essential to ovarian development and ovulation in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95:192-200.

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

Kobayashi, M., y Stacey, N.E. 1993. Prostaglandin-induced female spawning behavior in goldfish (*Carassius auratus*) appears independent of ovarian influence. *Horm. Behav.* 27:38-55.

Kyle, A.L., Stacey, N.E., Peter, R.E., Billard, R. 1985. Elevations in gonadotropin concentrations and milt volumes as a result of spawning in the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 57:10-22.

Lin, H.R., Peng, C., Lu, L.Z., Zhou, X.J., Van Der Kraak, G., y Peter, R.E. 1985. Induction of ovulation in the loach (*Paramisgurnus dabryanus*) using pimozide and [D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-N-ethyl-amide]-LHRH. *Aquaculture.* 46:333-340.

Lin, H.R. Liang, J.Y. Van der Kraak, G., y Peter, R.E. 1987. Stimulation of gonadotropin secretion and ovulation in common carp by an analogue of salmon GnRH and domperidone. En Ohnishi, E. Nagahama, Y. y Ishizaki, H. eds. *Proceedings of the First Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology.* Japan: Nagoya University Corporation, pp. 155-156.

Lin, X.W., Lin, H.R., y Peter, R.E. 1993. Growth hormone and gonadotropin secretion in the carp comun (*Cyprinus carpio* L.): "in vitro" interactions of gonadotropin-releasing hormone, somatostatin, and dopamine agonist apomorphine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89: 62-71.

Lin, X.W., y Peter, R.E. 1996. Expression of salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II precursor messenger ribonucleic acids in the brain and ovary of goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101:282-296.

Lin, X.W., y Peter, R.E. 1997. Cloning and expression pattern of a second [His<sup>5</sup> Trp<sup>7</sup> Tyr<sup>8</sup>] gonadotropin-releasing hormone (chicken GnRH-II) mRNA in goldfish: Evidence for two distinct genes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170:262-272.

Marchant, T.A., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., y Peter R.E. 1989. Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinology*. 124:2509-2518.

Miwa, S., Yan, L., y Swanson, P. 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by *in vitro* ligand autoradiography. *Biol. Reprod.* 50:629-642.

Mohanty, B., Das, S., y Naik, D.R. 1997a. Immunocytochemistry of *pars tuberalis* of the pituitary gland in some Indian Wild birds: a comparative study. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108:109-118.

Mohanty, K.C., y Naik, D.R. 1997b. Immunohistochemistry and tinctorial affinity of adenohypophysial cells of the rat snake *Ptyas mucosus* (Colubridae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 105:302-313.

Naik, D.R., Sar, M., y Stumpf, W.E. 1980. Immunohistochemical identification of cells in the *pars distalis* of the pituitary of the lizard, *Anolis carolinensis*. *Histochemistry*. 69:19-26.

Naito, N., Hyodo, S., Okumoto, N., Urano, A., y Nakai, Y. 1991. Differential production and regulation of gonadotropins (GTH-I and GTH-II) in the pituitary gland of rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, during ovarian development. *Cell. Tissue Res.* 266:457-467.

Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., y Tanaka, M. 1994. Regulation os oocyte maturation in fish: 393-439. En: Hoar and Randall. *Fish Physiology*. Vol. XIII. Academic Press, N.Y.

Nozaki, M., Naito, N., Swanson, P., Miyata, K., Nakai, Y., Oota, Y., Suzuki, K., y Kawauchi, H. 1990a. 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., Nakai, Y., Suzuki, K., y Kawauchi,

H. 1990b. 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.

Okuzawa, K.M., Amano, M., Kobayashi, M., Aida, K., Hasegawa, Y., y Miyamoto, K. 1990. Differences in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in discrete brain areas of male and female rainbow trout according to age stage of maturity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80:116-126.

Okuzawa, K., Araki, K., Tanaka, H., Kagawa, H. Y., e Hirose, K. 1994. Molecular cloning of a cDNA encoding the prpro-salmon gonadotropin-releasing hormone of the red seabream. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96:234-242.

Olivereau, M., y Nagahama, Y. 1983. Immunocytochemistry of gonadotropic cells in the pituitary of some teleost species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50:252-260.

Omeljaniuk, R.J., Shih, S.M., y 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., y Peter, R.E. 1989. 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.

Pearson, A.K., Haynes, T.B., y Licht, P. 1998. Immunochemical identification of thyrotropes and gonadotropes in the *pars distalis* and *pars tuberalis* of the toad (*Bufo boreas*) with reference to ontogenic changes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111:83-94.

Peng, Ch., Huang, Y.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., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., Omeljaniuk, R.J., Sokolowska, M., Shih, S.H., y Billard, R. 1986 Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Recent Prog. Hormone Res.* 42:513-548.

Peter, R.E., Sokolowska, M., y Nahorniak, C.S. 1987. Comparision of [D-Arg<sup>6</sup>, Trp<sup>7</sup>, Leu<sup>8</sup>, Pro<sup>9</sup>Net]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A), and [D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>Net]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide, in stimulating gonadotropin release and ovulation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Can. J. Zool.* 65:987-991.

Peter, R.E., Lin, H.R., y Van der Kraak, G. 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture.* 74:1-10.

Peter, R.E., Yu, K.L., Marchant, T.H., y Rosenblum, P.M. 1990. Direct neural regulation of the teleost adenohypophysis. *J. Exp. Zool. Suppl.* 4:84-89.

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

Powell, J.F.F., Krueckl, S.L., Collins, P.M., y Sherwood, N.M. 1996. Molecular forms of GnRH in three model fishes: rockfish, medaka and zebrafish. *J. Endocrinol.* 150:17-23.

Rodríguez, C.R. 1984. Vademécum académico de medicamentos. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina, UNAM. Tomo II. pp. 746-747.

Rodríguez, L., Carrillo, M., Sorbera, L.A., Soubrier, M.A., Mañanós, E., Holland, M.C., Zohar, Y., y Zanuy, S. 2000. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120:67-74.

Saligaut, S., Linard, B., Mañanos, E.G., Kah, O., Breton, B., y Govoroun, M. 1998. Release of pituitary gonadotropins GTH I and GTH II in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Modulation by estradiol and catecholamines. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109:302-309.

Santos, A.J.G., Furukawa, K., Kobayashi, M., Bando, K., Aida, K., y Hanyu, I. 1986. Plasma gonadotropin and steroid hormone profiles during ovulation in the carp *Cyprinus carpio*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 52:1159-1166.

Schulz, R.W., Bogerd, J., Bosma, P.T., Peute, J., Rebers, F.E.M., Zandbergen, M.A., y Goos, H.J. Th. 1995. Physiological, morphological and molecular aspects of gonadotropins in fish with special reference to the African catfish, *Clarias gariepinus*. En Goetz, F.W. y Thomas, P., eds. *Reproductive Physiology of Fish, 1995*. Austin, TX: Fish Symposium 95, pp.2-6.

Schulz, R.W., y Goss, H.J. Th. 1999. Puberty in male fish: Concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*. 117:5-12.

Sloley, B.D., Trudeau, V.L., Dulka, J.G., y Peter, R.E. 1990. 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.M., y 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., y Nahorniak, C.S. 1985. The effects of different doses of pimozide and [D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-N ethylamide]-LHRH (LHRH-A) on gonadotropin release and ovulation in female goldfish. *Can. J. Zool.* 63:1252-1256.

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

Somoza, G., Yu, K.L., y Peter, R.E. 1988. Serotonin stimulates gonadotropin and growth hormone release in female and male goldfish, *Carassius auratus* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 72:374-382.

Stefanini, M., de Martino, C., y Zamboni, L. 1967. Buffer formaldehyde with picrate. 29-30. En *Histological and histochemical methods*. Ed. por Kiernan, J.A. Pergamon press. New York. 1990.

Suzuki, K., Kawauchi, H., y Nagahama, Y. 1987. Biological characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitaries. En *Proc. 1st. Congr. Asia and Oceania Soc. Comp. Endocrinol.*, Nagoya, November 4-7, 1987. E. Ohnishi, Y. Nagahama, and H. Ishizaki, eds., pp. 173-174.

Suzuki, K., Kawauchi, H., y Nagahama Y. 1988. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71:292-301.

Swanson, P., Suzuki, K., y Kawauchi, H. 1987. Effects of des-Gly<sup>10</sup> [D-Ala<sup>6</sup>] gonadotropin-releasing hormone ethylamide (GnRH<sub>a</sub>) on secretion of two distinct gonadotropins by salmonid pituitaries *in vitro*. En *Proc. 1st. Congr. Asia and Oceania Soc. Comp. Endocrinol.*, Nagoya, November 4-7, 1987 eds. E. Ohnishi, Y. Nagahama, and H. Ishizaki. pp. 93-94.

Swanson, P., Bernard, M., Nozaki, M., Suzuki, K., Kawauchi, H., y Dickhoff, W.W. 1989. Gonadotropins I and II in juvenil coho salmon. *Fish Physiol. Biochem.* 7:169-176.

Swanson, P., Suzuki, K., Kawauchi, H., y Dickhoff, W.W. 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GtH I and GtH II. *Biol. Reprod.* 44: 29-38

Tanaka, H., Kagawa, H., Okuzawa, K., y Hirose, K. 1993. Purification gonadotropins (PmGtH I and II) from red seabream (*Pagrus major*) and development of a homologous radioimmunoassay for PmGtH II. *Fish Physiol. Biochem.* 10:409-418.

Taylor y Burns. 1974. Localization of inmunoglobulins in parafin sections for formaldehyde fixed tissues. En *Techniques in clinical immunology*. Ed. por Thompson R.A. Blackwell scientific publication. Oxford. 1981.

Trudeau, V.L., Soley, B.D., Wong, A.O.L., y Peter, R.E. 1991. Mecanismos de sex steroid negative and positive feedback control of gonadotropin (GtH) secretion in teleosts. Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norwich, U.K.

Trudeau, V.L., Somoza, G.M., Nahorniak, C.S., y Peter, R.E. 1992. Interactions of estradiol with gonadotropin releasing hormone and thyrotropin releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. *Neuroendocrinol.* 56:483-490.

Trudeau, V.L., Soley, B.D., y Peter, R.E. 1993. GABA stimulation of gonadotropin-II release in goldfish: Involvement of GABA a receptors, dopamine, and sex steroids. *Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 34:348-355.

Trudeau, V.L., y Peter, R.E. 1995. Functional interactions between neuroendocrine systems regulating GtH-II release. En Goetz, F.W. y Thomas, P. eds. *Reproductive Physiology of Fish*, 1995. Austin, TX: Fish Symposium 95, pp. 44-45.

Van Oordt, P.G.W.J., y Peute, J. 1983. The cellular origin of pituitary gonadotropins in teleosts. En W.S. Hoar, D.J. Randall y E.M. Donaldson, eds. *Fish Physiology*, vol. IX.

pp. 137-186. Academic Press, New York.

Weir *et al.* 1974. Inactivation peroxidase. En Techniques in clinical immunology. Ed. por Thompson R.A. Blackwell scientific publication. Oxford. 1981.

Wong, A.O.L., Murphy, J.P., Chang, C.M., Neumann, A.Lo., y Peter, R.E. 1998. Direct actions of serotonin on gonadotropin-II and growth release from goldfish pituitary cells: interactions with gonadotropin-releasing hormone and dopamine and further evaluation of serotonin receptor specificity. *Fish Physiology and Biochemistry*. 19:23-34.

Yaron, Z. 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in carp. *Aquaculture*. 129:49-73.

Yoshiura, Y., Kobayashi, M., Kato, Y., y Aida, K. 1997. Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin  $\beta$  subunits (GtH-I $\beta$  and GtH-II $\beta$ ) from the goldfish, goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105:379-389.

Yu, K.L. Sherwood, N.M., y Peter, R.E. 1988. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides* 9:625-630.

Yu, K.L., y Peter, R.E. 1990. Dopaminergic regulation of brain gonadotropin-releasing hormone in male goldfish during spawning behavior. *Neuroendocrinology*. 52:276-283.

Yu, K.L., Rosenblum, P.M., y Peter, R.E. 1991. *In vitro* release of gonadotropin-releasing hormone from the brain preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81:256-267.

Yu, K.L., y Peter, R.E. 1991. Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85:138-146.

Yu, K.L., He, M.L., Chick, C.C., Chow, C.H., Chow, B.K.C., Chan, D.K.O., Dong, K.W., Lin, X.W., Chang, J.P., y Peter, R.E. 1997a. Gonadotropin-releasing hormones (GnRH) and GnRH receptors in goldfish. En *Satellite Symposium on GnRH, 13th International Congress of Comparative Endocrinology*. Tokyo, Japan. Abstract.

Yu, K.L. Lin, X.W. Bastos, J.C., y Peter, R.E. 1997b. Neural regulation of gonadotropin-releasing hormones in teleost fishes. En Parhar, I.S. y Sakuma, Y. eds. *GnRh neurons: Gene to Behavior*. Tokyo: Brain Shuppan Publishers.

Zanuy, S., Carrillo, M., Mateos, J., Trudeau, V., y Kah, O. 1999. Effects of sustaines administration of testosterone in pre-pubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *Aquaculture*. 117:21-35.