

108

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DISTRIBUCION DE LA SOMATOSTATINA EN EL ENCEFALO DE HEMBRAS DE PEZ DORADO DURANTE LA ETAPA DE RECRUDESCENCIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

ALBERTO JESUS RIOS FLORES

297480

ASESOR: M. EN C. RODOLFO CARDENAS REYGADAS



IZTACALA

MEXICO. 2001.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres,
por su apoyo durante todo este tiempo.
Gracias a su apoyo, de una u otra forma siempre estuvieron,
con migo.

A mis hermanos,
David y José por soportar las noches de desvelo.

A mi tía Juana,
por su apoyo incondicional, durante la carrera.

A mi prima Marcela,
por los consejos y apoyo en los momentos mas difíciles.

A todos mis tíos, tías, primos y primas, a mis abuelitas a mi amiga
Karina, Que de alguna forma me han apoyado.

AGRADECIMIENTOS .

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

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

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

Al Biol. Héctor Barrera Escorcía y A la Biol. Ma. Del Rocío García Bores, por sus sugerencias y comentarios para el enriquecimiento de este trabajo.

A todos mis amigos del Laboratorio de Histología: José Luis, Brenda, Selene, Nancy, Corina, Mayra, Benigno y Luis.

A mis amigos: Gabriela, Karla, Erika Aguilar, Nadia, Adriana, Katia, Daniel, Álvaro, Normand, Julio, Ileana, Lázaro, Omar, Raúl, Julio Ocampo, Paloma, Natividad, Karlita, Ginna, Miriam, Mayra, Saúl, Gustavo, Fernando, Sábás, Oralia y Janet.

INDICE

INTRODUCCIÓN	5
I. ESTRUCTURA DE LA SOMATOSTATINA	5
A) Actividad biológica de la somatostatina	5
B) Estructura primaria de la somatostatina	5
C) Genes que codifican para somatostatina	6
D) Formas moleculares para somatostatina	6
II. FUNCIÓN DE LA SOMATOSTATINA	7
III. DISTRIBUCIÓN DE LA SOMATOSTATINA	9
IV. FUNCIONES DE LA SOMATOSTATINA EN DIFERENTES SISTEMAS	10
V. IMPORTANCIA CLÍNICA DE LA SOMATOSTATINA	11
ANTECEDENTES	12
OBJETIVO	18
METODOLOGÍA	19
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	39
APÉNDICE	40
BIBLIOGRAFÍA	41.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANATÓMICAS

Área *ventralis* del telencéfalo *pars lateralis* (VI)
 Área *ventralis* del telencéfalo *pars ventralis* (Vv)
 Área *dorsalis* del telencéfalo *pars medialis* (Dm)
 Área *dorsalis* del telencéfalo *pars centralis* (Dc)
 Área *dorsalis* del telencéfalo *pars lateralis* (Dl)
 Área *dorsalis* del telencéfalo *pars dorsalis* (Dd)
 Comisura anterior (Ac)
 Tracto olfatorio (OIT)
 Tracto óptico (OT)
 Tejidos conectivos (CT)
 Nervio óptico (ON)
 Quiasma óptico (OC)
 Núcleo *enteropendecularis* (NE)
 Núcleo *preóptico periventricularis* (NPP)
 Núcleo *anterioris periventricularis* (NAPv)
 Núcleo *lateralis tuberis pars posterioris* (NLTp)
 Núcleo *diffusus toris lateralis* (NDTL)
 Núcleo *tenia* (NT)
 Núcleo *preglomeruloso pars medialis comisuralis* (NPGc)
 Núcleo *reticularis superioris* (NRS)
 Núcleo gustatorio secundario (SGN)
 Núcleo *reticularis inferioris* (NRI)
 Núcleo *reticularis medialis* (NRM)
 Tectum óptico (O Tec)
 Tegmento del cerebro medio (MT)
 Células de Mauthner (MC)
 Cerebelo (C)
 Tracto trigémino (DT)
 Fascículos longitudinales medialis (MLF)
 Nervio facial (FN)
 Lóbulo vago (VL)
 Sistema Nervioso Central (SCN)
Pars proximales distalis (PPD)

MOLÉCULAS

Somatostatina (SS ó SRIF)

Serotonina (5-HT)

Bombesina (BBS)

Colecistoquinina (CCK)

Norepinefrina (NE)

Neuropeptido Y (NPY)

Triyodotironina (T₃)

Tiroxina (T₄)

Péptido vasoactivo intestinal (VIP)

Hormona adrenocorticotrópica (ACTH)

Hormona liberadora de corticotropina (CRH)

Hormona de crecimiento (GH)

Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH)

Hormona estimulante de la hormona gonadotrópica (GnRH)

Hormona estimulante de la hormona leutinizante (LHRH)

Hormona liberadora de la tiotropina (TRH)

Hormona estimulante de la tiroides (TSH)

Factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I)

Factor estimulante de corticotropina (CRF)

RESUMEN

La somatostatina es un tetradecapeptido descubierto por Brazeu *et al.* (1973), es el principal inhibidor de la secreción de la hormona de crecimiento. Su distribución es amplia dentro del organismo, pudiéndose encontrar en el sistema nervioso central, hipófisis, páncreas, intestino, riñón, glándulas suprarrenales y en todos ellos actúa como inhibidor. El presente trabajo identificó su distribución en el encéfalo de hembras de pez dorado en recrudescencia por medio de inmunohistoquímica, encontrándose en el cerebro anterior en los núcleos; *enteropendecularis*, *preóptico periventricularis*, *anterioris periventricularis*, *lateral tuberis pars posterioris*, *difusus toris lateralis*, núcleo tenia, *preglomeruloso pars medialis comisuralis*. Áreas; *ventral lateralis*, *ventralis del telencéfalo pars centralis*, *dorsalis medialis*, *dorsalis centralis*, *dorsalis lateralis*, *dorsalis dorsalis*, así como; comisura anterior, tracto olfatorio, tracto óptico, nervio óptico, quiasma óptico. En cerebro medio; tectum óptico, tegmento del cerebro medio, células de Mauthern. Cerebro posterior; cerebelo, tracto trigemino, *fascículos longitudinalis medialis*, nervio facial, lóbulo vago y los núcleos; *reticularis superioris*, gustatorio secundario, *reticularis inferioris*, *reticularis medialis*. Estos datos son los primeros reportados en *Carassius auratus* en etapa de recrudescencia, identificando las áreas en el encéfalo completo para somatostatina.

INTRODUCCIÓN

I. ESTRUCTURA DE LA SOMATOSTATINA

A. Actividad biológica de la somatostatina.

La actividad biológica reconocible de la somatostatina (SS ó SRIF) fue encontrada por primera vez por Krulich *et al.*, en 1968. Los trabajos identificaron una sustancia inhibitoria de la hormona de crecimiento (GH), caracterizada por un bajo peso molecular (Fig. 1), con una actividad reconocible en hipófisis y producida en el hipotálamo. Hellman y Lenmark (1969), reportaron la presencia de un potente factor inhibitorio de la insulina en extractos de islotes pancreáticos de palomas. Esta molécula fue aislada en 1973 por Brazeau *et al.*

Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys.

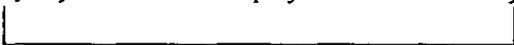


Fig.1 Estructura primaria de Somatostatina 14 (en mamíferos)

La somatostatina se sintetiza como parte de una molécula grande, su precursor (pre-pro SS) se procesa rápidamente a la forma (pro-SS). En mamíferos la pro-SS, pesa 10- kilodalton (kDa), es una molécula de 92 aminoácidos con un segmento terminal C y un segmento terminal N, pudiendo formar las dos formas bioactivas la SS-14 y SS-28.

B. Estructura primaria de la somatostatina.

La estructura primaria de la SS-14 ha sido fuertemente conservada durante la evolución. En particular, esta secuencia es idéntica en mamíferos (Brazeau *et al.*, 1973), aves (Spiess *et al.*, 1979), reptiles (Conlon y Hicks, 1990); anfibios y peces (Wang y Conlon *et al.*, 1985). En agnathos se presentan dos genes no alélicos para la forma de SS-14 en el páncreas. Este tetradecapéptido en el encéfalo presenta la misma estructura que la de mamíferos. (Andrews *et al.*, 1988; Conlon *et al.*, 1988; Sower *et al.*, 1994; Conlon *et al.*, 1995).

La conservación total de la estructura de aminoácidos de pro- SS desde peces hasta mamíferos sugiere un papel biológico importante para esta molécula, quizá, como el reconocimiento sobre la señal de pro-SS para el sitio de unión de la prohormona en su sitio intracelular de procesamiento (Patel, 1992).

La SS-14 es un importante regulador en la secreción de GH en el pez dorado. La acción biológica de SS-14 ha sido altamente conservada a lo largo de la evolución (Marchant *et al.*, 1987).

C. Genes que codifican para somatostatina.

Ahora sabemos que, la somatostatina proviene filogenéticamente de una familia de multigenes contando con varios genes y péptidos. Dos de ellos con una importancia bioactiva, SS-14 y SS-28 (Patel, 1992).

En teleósteos, la presencia de una familia de varios genes de SS ha sido demostrada por clonación de DNA complementarios (cDNAs) que codifican para SS-14 y formas mayores de SS (SS-25 y SS-28) (Conlon *et al.*, 1997, Lin *et al.*, 1998, Lin *et al.*, 2000). En otro estudio, se revelan tres formas de SS a partir de cDNAs aisladas del cerebro de pez dorado, los cuales codifican para tres preprosomatostatina (PSS) designados como PSS-I, PSS-II y PSS-III. Dentro de la secuencia de SS-14, está presenta una secuencia idéntica a la SS-14 de mamíferos, las otras dos que codifican para SS-28 (Glu¹, Tyr⁷, Gly¹⁰), y (Pro²)- SS-14 respectivamente (Lin *et al.*, 1999).

D. Formas moleculares de la somatostatina.

La somatostatina es un tetradecapéptido (14 aminoácidos) con una secuencia que incluye dos cisteínas unidas por un puente disulfuro (Fig.1). Esta forma molecular es conocida como somatostatina14 (SS-14 ó SRIF-14). Sin embargo, existe otra forma que incluye la secuencia de aminoácidos de la somatostatina 14, y presenta una extensión en su extremo amino terminal con otros 14 aminoácidos. Esta forma molecular es denominada somatostatina 28 (SS-28 ó SRIF-28).

Además de estos tipos descritos en mamíferos, en peces se han encontrado otras dos variantes de somatostatina, somatostatina 22 (SS-22 ó SRIF-22), la cual fue aislada a partir de una especie de bagre *Ictalurus*, que también contiene una secuencia de 14 aminoácidos muy parecida a la molécula base de SS-14 en donde 7 de estos 14 aminoácidos son idénticos, y presentan una extensión de otros ocho aminoácidos hacia el extremo amino terminal (Andrew *et al.*, 1984), y la somatostatina 25 (SS-25 ó SRIF-25) aislada a partir del salmón *Oncorhynchus kisutch*, que al igual que el resto de las somatostatinas presenta incorporado en su porción carboxilo terminal, una secuencia de aminoácidos muy parecida en relación con las anteriores moléculas, y una extensión amino terminal de otros 11 aminoácidos. Estas dos últimas fueron aisladas a partir del páncreas endócrino de las especie correspondiente. La SS-25 parece guardar una mayor relación fisiológica con el metabolismo de la glucosa, pues cuando se inyectó a salmones juveniles, los resultados fueron la disminución de los niveles de insulina en la sangre, la utilización del glucógeno hepático y la activación de las vías lipolíticas (Plisetskaya *et al.*, 1986)

II. FUNCIÓN DE LA SOMATOSTATINA

Entre las funciones de la somatostatina se encuentran: la inhibición de la secreción de la hormona de crecimiento (GH), de la hormona estimulante de la hormona de la tiroides (TRH) y hormonas que controlan directamente el metabolismo como tiroxina y triyodotironina (Patel, 1992). Fundamentalmente, juega un papel inhibitor en todos los sistemas en los cuales se ha encontrado (Patel y Srikant, 1997). Al igual que en el resto de otros grupos de vertebrados, en peces se ha demostrado que la somatostatina es el inhibidor natural de la secreción de la hormona de crecimiento, ello en especies como el pez dorado *Carassius auratus* (Marchant, *et al.*, 1987) y la trucha arcoiris *Oncorhynchus keta* (Luo y Mckewon., 1991).

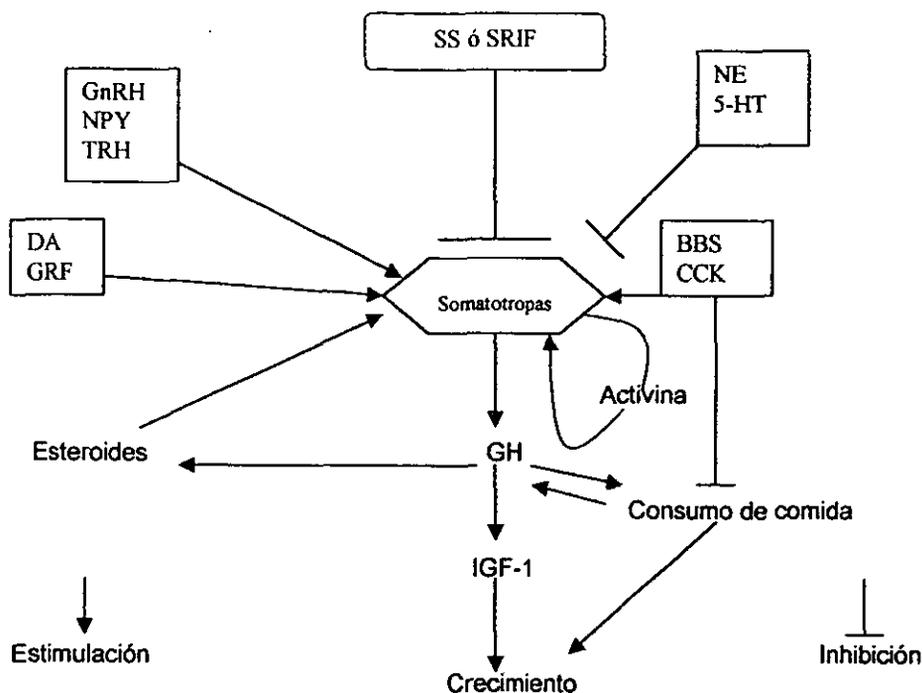


Fig.2 Modelo multifactorial, de la regulación neuroendocrina de la secreción de la hormona de crecimiento (GH), consumo de alimento y crecimiento en pez dorado. Abreviaciones: bombesina, BBS; colecistoquinina, CCK; dopamina, DA; factor estimulante de la secreción de GH, GRF; hormona estimulante de la hormona gonadotrópica, GnRH; neuropeptido Y, NPY; norepinefrina, NE; serotonina, 5-HT; somatostatina, SS; hormona estimulante de la tiroides, TRH (Modificado de Peng y Peter 1997).

Las hormonas esteroides tienen una marcada influencia en la secreción de la hormona de crecimiento. Así Tannenbaum en 1991, describe en mamíferos que existe un dimorfismo sexual en los ritmos de secreción de GH. En peces (Holloway *et al.*, 1997) establece que en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* tratados con estradiol no son afectados significativamente en la secreción basal de GH, después de haber sido tratados con SS-14. Peng y Peter, (1997), establecen que de acuerdo al momento del ciclo reproductivo, diversos factores son capaces de estimular la secreción de GH, encontrándose entre ellos, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la Dopamina (DA), la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GRF) y otros. Para todos ellos la somatostatina es la molécula inhibidora de la secreción (Fig. 2).

III. DISTRIBUCIÓN DE LA SOMATOSTATINA

Entre los órganos que de manera natural producen dicho péptido, además de la zona hipotalámica, se encuentran: el sistema nervioso central (SNC): telencéfalo, el diencefalo, el mesencéfalo, el rombencéfalo y la médula espinal; Los islotes de Langerhans en especial en las células δ del páncreas endocrino, el tracto gastrointestinal, y la retina (Patel, 1992).

La SS presenta una distribución heterogénea, y está presente en muchos tejidos del cuerpo de vertebrados (Tabla 1). Entre las regiones con más abundancia están, el sistema nervioso, páncreas, e intestino. Regiones donde se reporta menor presencia son: corteza adrenal, placenta, órganos reproductivos, glándula submandibular, tiroides y sistema urinario (Patel, 1997). Se han detectado en el corazón fibras con contenido de SS, (Patel 1992). La morfología típica en apariencia de una célula con SS puede ser la neurona con múltiples procesos de bifurcación, una célula frecuentemente secretora. Dentro del hipotálamo, el lugar más destacado de células positivas a SS yace en la región anterior paraventricular, (Finley JCW *et al.*, 1981; Johanson O *et al.*, 1984; Krisch B, 1979). Fuera del hipotálamo, neuronas positivas o fibras se presentan abundantemente en todo el SNC, con la excepción notable del cerebelo (Finley JCW *et al.*, 1981; Johanson O *et al.*, 1984).

Se ha encontrado la presencia de SS-14 en el encéfalo de pez dorado *Carassius auratus*, la detección de dicha hormona en neuronas se ha podido observar en varias regiones del cerebro, como: telencéfalo, hipotálamo, epítálamo, cerebro medio, médula espinal (Pikavance *et al.*, 1992).

En pez dorado se ha demostrado que en el encéfalo existe una alta densidad de receptores a SS-14, incluyendo núcleo preóptico, núcleo preóptico paraventricular, núcleo anterior paraventricular, núcleo lateral, núcleo ventromedial y núcleo difusos de lóbulos inferiores. En el cerebro medio y posterior se encontró en el tectum óptico, lóbulo facial, lóbulos vagos y el haz mesencéfalo-cerebelar (Cárdenas *et al.*, 2000).

IV. FUNCIONES ATRIBUIDAS A LA SOMATOSTATINA EN DIFERENTES SISTEMAS.

SISTEMA	FUNCIÓN
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	Hiperquinesia, rigidez, efectos autonómicos, procesos cognoscitivos.
HIPOTÁLAMO	Inhibición de la secreción de CRH, TRH, GHRH, NE.
HIPÓFISIS	Inhibición de la secreción de ACTH, TSH y GH.
PÁNCREAS	Inhibición de la secreción de insulina, glucagon, somatostatina, enzimas y bicarbonato.
TRACTO GASTROINTESTINAL	Inhibición de la secreción de gastrina, secretina, CCK, VIP, motilina, neurotensina, ácido gástrico, pepsina, reducción del flujo sanguíneo, reducción de la absorción de iones y nutrientes, disminución de la proliferación de las células de la mucosa.
RIÑÓN	Inhibición de la secreción de renina, y de la absorción de agua.
SUPRARENALES	Inhibición de la secreción de aldosterona y catecolaminas.
TIROIDES	Inhibición de la secreción de T ₄ , T ₃ , y calcitonina.

Tabla 1. Principales acciones de la somatostatina; ACTH, hormona adrenocorticotrópica; CCK, colecistocinina; VIP, péptido vasoactivo intestinal; CRH, hormona liberadora de la corticotropina; GH, hormona de crecimiento; GHRH, hormona liberadora de la hormona de crecimiento; NE, norepinefrina; T₃, triyodotironina; T₄, tiroxina; TRH, hormona liberadora de la hormona estimulante de la tiroides; TSH, hormona estimulante de la tiroides. (Modificado de Cárdenas, 1998)

V. IMPORTANCIA CLINICA DE LA SOMATOSTATINA

La importancia clínica de la molécula se pone de manifiesto no sólo por su actividad sobre órganos endócrinos, sino también sobre el sistema nervioso central propiamente dicho, pues se halla ligada a algunos eventos como la actividad locomotora, procesos cognoscitivos y de comportamiento (Bruns *et al.*, 1995), además de algunas patologías del humano, detectadas para dicho sistema. Ejemplo de ello son: El incremento de somatostatina en el ganglio basal en la enfermedad de Huntington y sus bajas concentraciones asociadas a la corteza en la enfermedad de Alzheimer (Patel, 1992).

Otra posibilidad reciente para esta molécula, ha sido su aplicación con el objeto de controlar la división celular desmedida de algunos tipos de cánceres. Se han realizado experimentos en los cuales se administra algún tipo de análogo de la somatostatina, a pacientes con acromegalia y los resultados reportan una mejora sustantiva en la cantidad de hormona de crecimiento en la sangre y una concentración normal de factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-1), en proporciones que son del 90% y 70% respectivamente, y se ha comprobado que en el 50% de los pacientes que sufren esta enfermedad, el tumor se reduce de tamaño, demostrando con ello, la capacidad del análogo como inhibidor de la proliferación celular. Desafortunadamente, el tratamiento es extremadamente costoso por lo cual no todos los pacientes pueden tener acceso a dicha terapia (Lamberts *et al.*, 1996).

De manera lamentable, otros tipos de cánceres o enfermedades que, en teoría, podrían haber sido susceptibles de ser tratados con análogos de somatostatina, cuando el tratamiento se ha aplicado a pacientes, los resultados no fueron positivos. Entre estas enfermedades tenemos algunos tumores neuroendocrinos y adenocarcinomas, el sangrado gastrointestinal, y la pancreatitis causada por endoscopia retrógrada (Lamberts *et al.*, 1996).

ANTECEDENTES

Estudios realizados en peces

Dubois P M, *et al* (1979), por medio de inmunofluorescencia, detectaron la evidencia de somatostatina, LHRH, Neurofisina y α -endorfina en el encéfalo y tracto digestivo de trucha arcoiris. En el diencéfalo la reacción para SS, se encontró en la región periventricular y en los endoteliales que se ubican en la región del núcleo preóptico (NPO) esparcidos en células pequeñas, en el *núcleo lateralis tuberis pars anterioris* (NLTa), en el *núcleo preóptico periventricularis* (NPP) y en pocas células localizadas en los núcleos dorsomediales del hipotálamo. En la hipófisis se detectó en el tejido neurohipofisial, en el *pars proximalis distalis* (PPD) de la adenohipófisis, en el intestino, en el páncreas y en la mucosa gástrica. Comparando con la reacción para la hormona estimulante de la hormona lutinizante (LHRH) con la somatostatina, tienen una distribución similar en la hipófisis. La reacción para neurofisina se encontró en lóbulos neurointermedios. Células que reaccionan con anti- α -endorfina se encontraron en el NLT, en la hipófisis en la región del tallo y en todas las células de las pars intermedios de los lóbulos neurointermedios.

Olivereau M *et al* (1984), realizaron investigaciones sobre somatostatina utilizando la técnica inmunohistoquímica, tanto en el encéfalo como en la hipófisis de especies diferentes de teleosteos (*Salmo irideus*, *Salmo fario*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus keta*, *Mugil ramada*, *Myoxocephalus octodecimspinosus*, *Colisa lalia*, *Anguilla anguilla*). En el encéfalo, la reacción fue observada en el núcleo preóptico periventricular, núcleo entopendecular, núcleo anterior periventricular y núcleo lateral tuberis. En la hipófisis la reacción a SS ocurrió en el área *pars proximalis distalis* (PPD), donde se encuentra la hormona de crecimiento (GH) (ciprinidos), en la lamina basal neuroglandular de la PPD (salmónidos). En el mismo año Olivereau M *et al*, (1984), identificó inmunocitoquímicamente los péptidos CRF, (factor estimulador de la corticotropina) y SS en el cerebro e hipófisis de ciprinidos. La reacción a somatostatina se restringió en la hipófisis al área *pars proximalis distalis* (PPD) en las células somatotropas. Los datos encontrados en este trabajo presentan una concordancia en la localización de somatostatina reportados por Kah *et al*, (1982).

Kah *et al* (1982), localizó la somatostatina por inmunofluorescencia en el encéfalo anterior de Ciprinidos, *Carassius auratus* y de *Gambusia sp.* Las neuronas donde se localizó reacción a somatostatina fueron: *núcleo preóptico periventricularis* (NPP), *núcleo lateralis tuberis* (NLT) y núcleo dorsomedial, en el nivel posterior del encéfalo en el *núcleo anterior periventricularis* (NAPv) y la parte rostral del núcleo ventromedial talami (NVM). En la hipófisis la reacción se detecta en el *área proximal pars distalis*.

Pikavance, *et al* (1992), localizan la distribución del neuropéptido Y (NPY) y de la somatostatina (SS) en el encéfalo de pez dorado utilizando inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia respectivamente. Ambos péptidos tuvieron una distribución muy semejante en muchos lugares. Un alto grado de localización del NPY y SS se encontraron en las neuronas del telencéfalo ventrolateral (VI), núcleo entopendecular (NE) y núcleo dorsocentral del telencéfalo (Dc). En el VI y NE, la exposición de neuronas inmunoreactivas a NPY exhibieron SS y viceversa. La otra parte de localización fue en el tallo cerebral, teniendo al NPY y SS una localización en los cuerpos celulares de la columna media y del complejo motor vagal, la inmunoreacción del NPY y SS tuvo una distribución en: núcleo preóptico periventricularis (NPP), núcleo preóptico (NPO), núcleo *anterioris periventricularis* (NAPv), núcleo *lateralis tuberis pars lateralis* (NLTl), núcleo *lateralis tuberis* (NLT), núcleo *lateralis tuberis pars anterioris* (NLTa), núcleo *lateralis pars posterioris* (NLTp), núcleo *posterioris periventricularis* (NPPv), núcleo dorsolateral talami (NDL), núcleo dorsomedial talami (NDM), núcleo ventromedial talami (NVM), núcleo *preglomeruloso pars lateralis* (NPGl), núcleo *difusos tori lateralis* (NDTL), núcleo posterior talami (NTP), núcleo *recessus lateralis* (NRL) y en el tectum óptico (OT).

La localización se encontró en muchas fibras, aunque en muchos núcleos del telencéfalo las fibras inervan a la vejiga natatoria, un órgano de la periferia en las cuales las neuronas de la columna media se proyectan en el complejo motor vagal. Los procesos en el *torus semicircularis* y en el lóbulo vago fueron observados por la inmunoreacción de SS y NPY en distintos modelos laminares. La somatostatina se encontró en las terminales en forma de canasta en la eminencia granularis del cerebelo. El NPY y la somatostatina se encontraron en fibras, el núcleo gustativo secundario, el lóbulo facial, el tracto trigémino, en la formación reticular y la médula espinal.

Cárdenas *et al* (2000) establecen la caracterización y la distribución de receptores a somatostatina, en todo el encéfalo de pez dorado. Los sitios de unión son caracterizados en el encéfalo de pez dorado. La unión de ^{125}I - [Tyr¹¹]- SS - 14 en preparaciones de membranas de encéfalo, se encontraron por ser saturable; reversibles, tiempo, temperatura, y pH dependientes. La unión era también desplazada por formas diferentes de SS. Bajo condiciones óptimas (22°C, pH 7.2), el equilibrio que compromete de ^{125}I - [Tyr¹¹] - SS - 14 a las membranas de encéfalo de pez dorado se logró después de 60min de incubación. El análisis de saturabilidad reveló un sitio de interacción en una K_a de 1.3 nM. SS-14, SS-28 mamífero, y salmón SS-25, se desplazó ^{125}I - [Tyr¹¹]- SRIF - 14 con una afinidad similar. Considerando otros neuropéptidos, como la sustancia P, metencefalina y VIP, no presentan capacidad para desplazar ^{125}I - [Tyr¹¹]- SS-14. La autoradiografía demostró que ^{125}I - [Tyr¹¹]- SS-14 se une a sitios que se encuentran a lo largo del encéfalo de pez dorado. Una densidad alta de sitios de unión a ^{125}I - [Tyr¹¹] - SS-14, se encontraron en la parte anterior del cerebro, incluyendo el núcleo preóptico (NPO), el *núcleo preóptico periventricularis* (NPP), *núcleo anterior periventricularis* (NAPv), *núcleo lateral tuberis* (NLT), *núcleo dorsomedialis talami* (NDM), *núcleo dorsolateralis talami* (NDL), *núcleo ventromedialis talami* (NVM), y *núcleo diffusus lobi inferioris* (NDLI). En encéfalo medio, receptores a SS-14 se encontraron en el tectum óptico. Los lóbulos facial y vagos, el haz mesencefálico-cerebelar. Este estudio provee la primera caracterización y distribución de los sitios de unión específicos a SS-14 en encéfalo de pez dorado.

Los ciclos fisiológicos están controlados por factores ambientales. En los teleósteos, los ciclos sexuales están controlados por factores ambientales y se encuentran variaciones en la producción de hormonas esteroides sexuales (Kobayashi *et al.*, 1986), las que además de servir a propósitos reproductivos y /o establecer caracteres sexuales secundarios afectan otros procesos fisiológicos como patrones de secreción de la hormona de crecimiento. Variaciones estacionales de somatostatina en relación con el ciclo sexual se han identificado en pez dorado (Marchant *et al.*, 1989) y al ser ella el principal inhibidor de

la secreción de GH, es importante estudiar su distribución en cada una de las etapas del ciclo sexual.

Los ciclos estacionales en la reproducción es importante en muchos teleósteos de climas templados, para asegurar la oportunidad de desovar la cual coincide con las condiciones ambientales adecuadas y una abastecimiento nutritivo necesario para la supervivencia y el crecimiento. Siguiendo el desarrollo del pez, después del primer desove, el ciclo gonádico del pez adulto se encuentra dividido en tres etapas generales; regresión, recrudescencia o reinicio del desarrollo y madurez, conduciendo a otro período de desove (Blázquez *et al*, 1998).

En el pez dorado ha resultado ser un modelo útil para el estudio de la reproducción estacional, al ser un miembro de representativo de los ciprínidos, un grupo importante de peces que están ampliamente distribuidos en climas subtropicales y templados. En estas especies, la etapa de recrudescencia gonadal es paralela al incremento de los niveles de GTH-II (hormona estimuladora de gonadotropina - II) en suero (Habbibi *et al*, 1989; Sokolowska *et al*, 1985). Después de la maduración gonadal, el desove ocurre en respuesta a factores externos como feromonas y cambios ambientales (Aida K.A, 1988; Stacey *et al*, 1994). Con anterioridad al desove, surge un pico de GTH-II, resultando los niveles máximos de GTH-II promoviendo la esperma en machos y la ovulación en hembras. La etapa de desove es seguida por la regresión que involucra una declinación en los niveles de GTH-II en suero y la reabsorción de cualquier remanencia de vitelo en las gónadas (Blázquez *et al*, 1998).

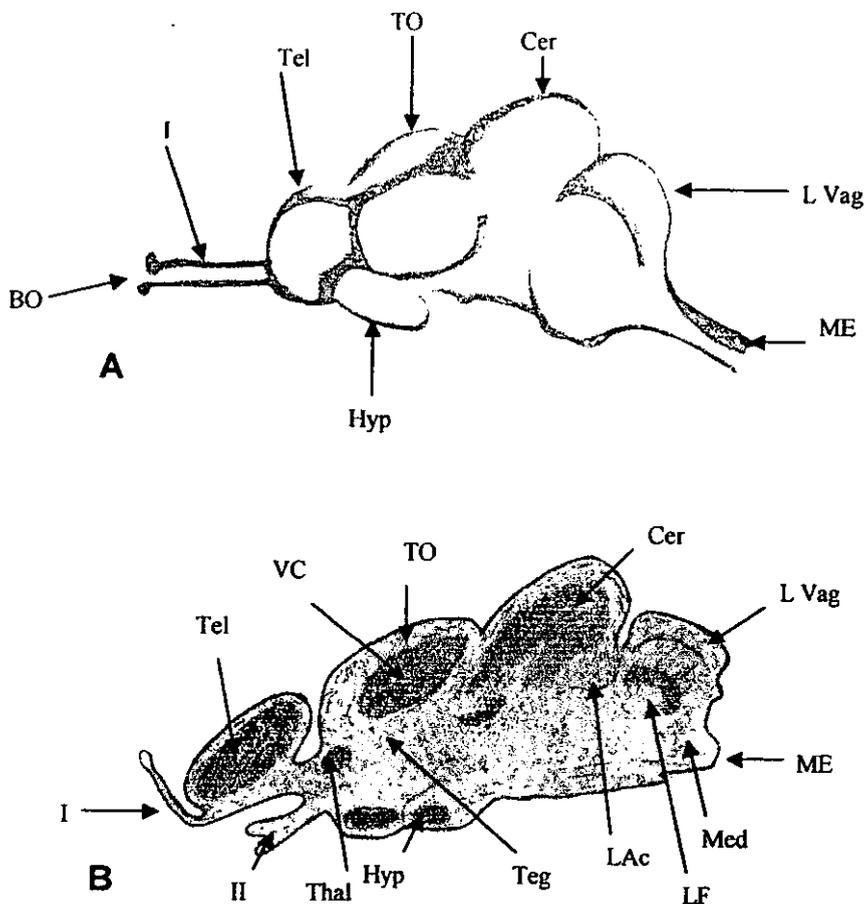
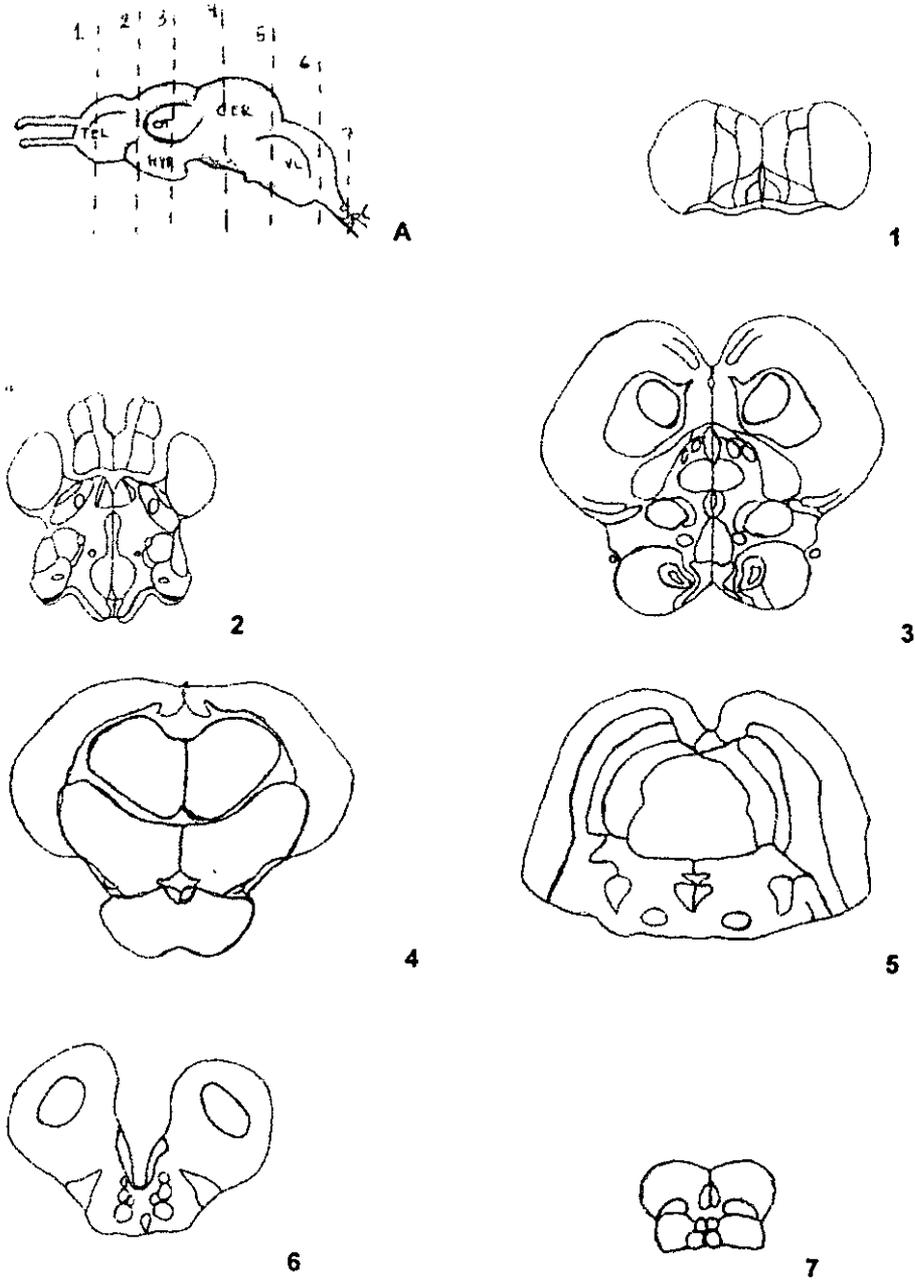


Fig. 3, Esquema general del encéfalo de pez dorado en posición lateral (A) y posición longitudinal (B) mostrando las estructuras que lo componen; BO, bulbo olfatorio; I, nervio olfatorio; Tel, telencéfalo; TO, tectum óptico; Hyp, hipotálamo; Cer, cerebelo; L Vag, lóbulo vago; ME, medula espinal; Thal, Tálamo; Teg, Tegmento; LAc, lóbulo acústico; LF, lóbulo facial; Med, medula oblongata, VC, válvula del cerebelo (Modificado de Jerald J. Berstein, 1970).

Fig. 4, Representación del encéfalo de pez dorado; A) encéfalo completo de pez dorado, con los cortes numerados: I) corte transversal en 1, cerebro anterior, II) corte transversal en 2, cerebro anterior, III) corte transversal en 3, cerebro medio, IV) corte transversal en 4, cerebro posterior, V) corte transversal en 5, cerebro posterior, VI) corte transversal en 6, cerebro posterior, VII) corte transversal en 7, espina dorsal (Modificado de Cárdenas, 1998).

Fig. 4 Representación del encéfalo de pez dorado.



OBJETIVO

Establecer la distribución de somatostatina 14 en el encéfalo de pez dorado hembra durante la etapa de recrudescencia.

METODOLOGÍA

Los organismos fueron comprados a granjas piscícolas locales. Los peces fueron mantenidos en piletas de 1250 lts de capacidad, a 20 ± 1 °C con aireación continua. Alimentados diariamente con alimento comercial balanceado (Wardley), con un fotoperíodo de acuerdo al fotoperíodo natural de la Cd. de México.

Se utilizó la técnica inmunohistoquímica modificada de (Taylor y Burns 1974; Elson 1995). La obtención de las muestras fue a través de un proceso donde se anestesiaron los ejemplares de *Carassius auratus* por medio de inmersión en agua con tricaina metano sulfanato (MS 222), a una concentración de 0.05%. Cuando cesó el movimiento opercular, los peces fueron sacrificados por medio de un corte de la médula espinal.

TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA.

Los encéfalos se fijaron con un amortiguador de paraformaldehído con picrato (2hrs), posteriormente se lavaron en un amortiguador de fosfatos (PBS, dilución 1:3), se deshidrataron por medio de una concentración creciente de etanol, (70, 80, 90, 96%, absoluto), después fueron infiltrados con parafina I y II por dos horas e incluidos en paraplast. Se realizaron cortes seriados a 15 micrómetros de grosor.

Los cortes se desparafinan en Xilol I, se rehidrataron por pasos sucesivos de concentraciones decrecientes de etanol hasta llegar a agua, para enseguida permeabilizarlos en metanol a 4°C, se inactivaron la peroxidasa endógena con etanol- ácido y se lavaron con PBS, 1:3. Se bloquearon con suero bovino al 1% en (PBS IX) a temperatura ambiente por 30 minutos.

Se incubaron con anticuerpo Antisomatostatina de conejo por un periodo de 24 hrs. a 4°C a una dilución 1/100. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS, 1:3. La incubación del 2° anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti IgG de chivo anticonejo H+L) fue por 2 hrs a una dilución 1/100. Se realizaron dos lavados con PBS, 1:3.

La reacción fue revelada por medio de una solución de diaminobencidina (DAB) 20mg DAB – 100 ml PBS y 500 microlitros de H₂O₂ (33 microlitros de H₂O₂ al 30% + 967 microlitros de H₂O destilada) por 15 minutos, para después lavar con PBS, 1:3 y contrateñir con Hematoxilina de Mayer. Finalmente, los cortes fueron deshidratados en alcoholes graduales y montados con resina sintética (Diagrama).

La observación de los cortes se realizó con un microscopio Carl Zeiss bifocal. Las áreas del encéfalo, donde se registró la presencia de SS-14, fueron determinadas de acuerdo al mapa reportado por Peter y Gill, (1975).

El reconocimiento de la etapa del pez se realizó basándose en el índice gonadosomático* .

CONTROLES

Se realizaron cuatro ensayos, observando que la inmunoreacción fuera específica para somatostatina, el primero se realizó sin inactivar la peroxidasa endógena agregando el sustrato, el cual tuvo una reacción negativa. El segundo ensayo se realizó inactivando la peroxidasa, agregando el sustrato sin los anticuerpos en la que se observó una reacción negativa. El tercer ensayo se realizó sin bloquear los sitios inespecíficos sin primer anticuerpo (antisomatostatina) y con el segundo anticuerpo (anti IgG de chivo anticonejo H+L), diluido en PBS, en el cuál también se observó una reacción negativa. El último ensayo, se realizó con el segundo anticuerpo (anti IgG de chivo anticonejo H+L), diluido en suero bovino, sin el primer anticuerpo (antisomatostatina), el cual presentó una reacción negativa, a todos los controles, se les siguió con el mismo procedimiento de la técnica inmunohistoquímica (Taylor y Burns., 1974. Elson, 1995) para observar la reacción que estos presentaban.

** Ver apéndice*

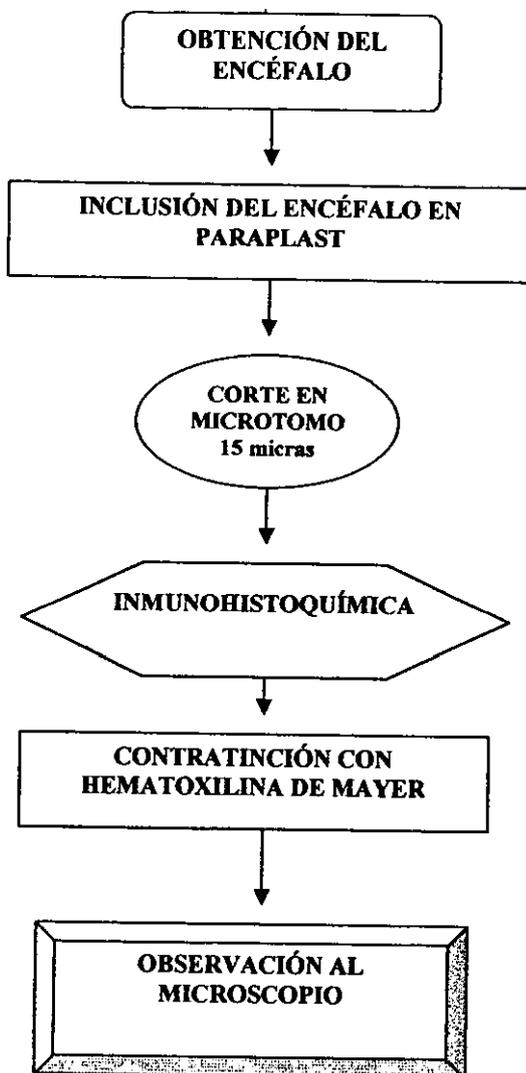
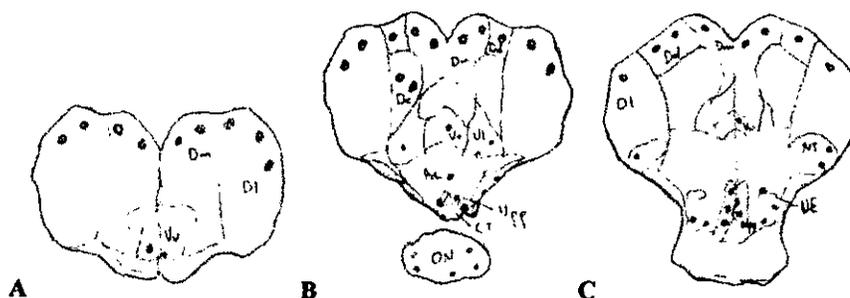
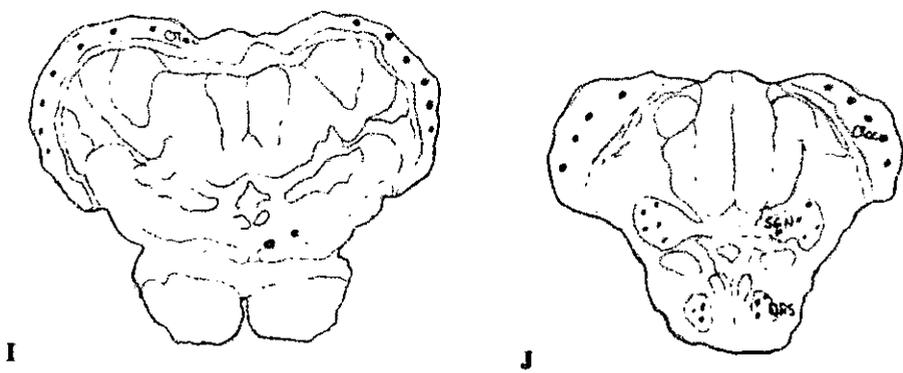
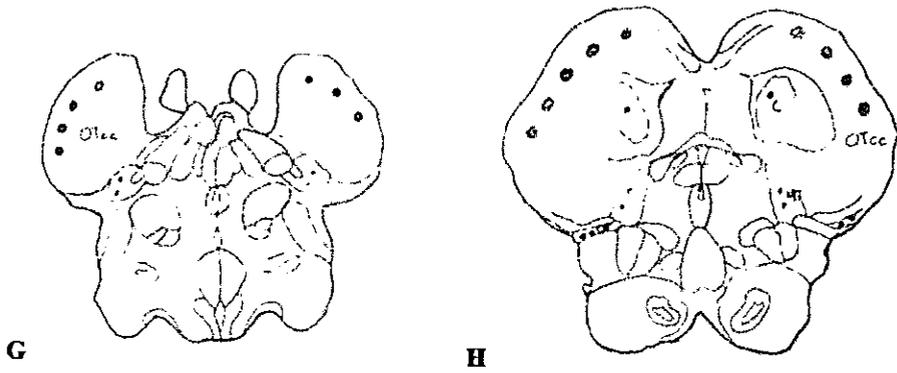
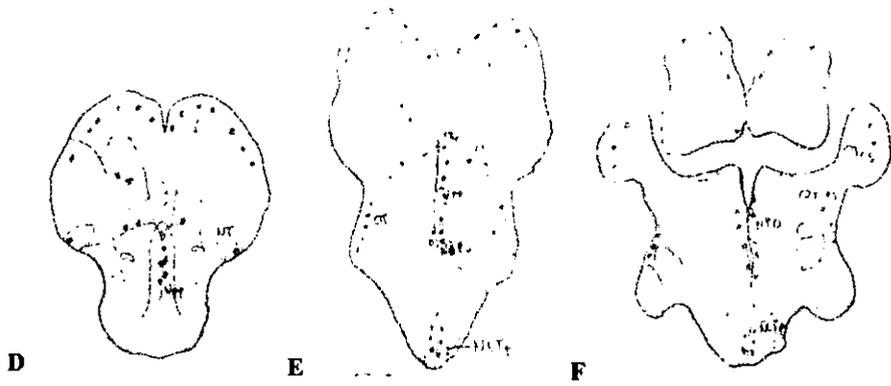


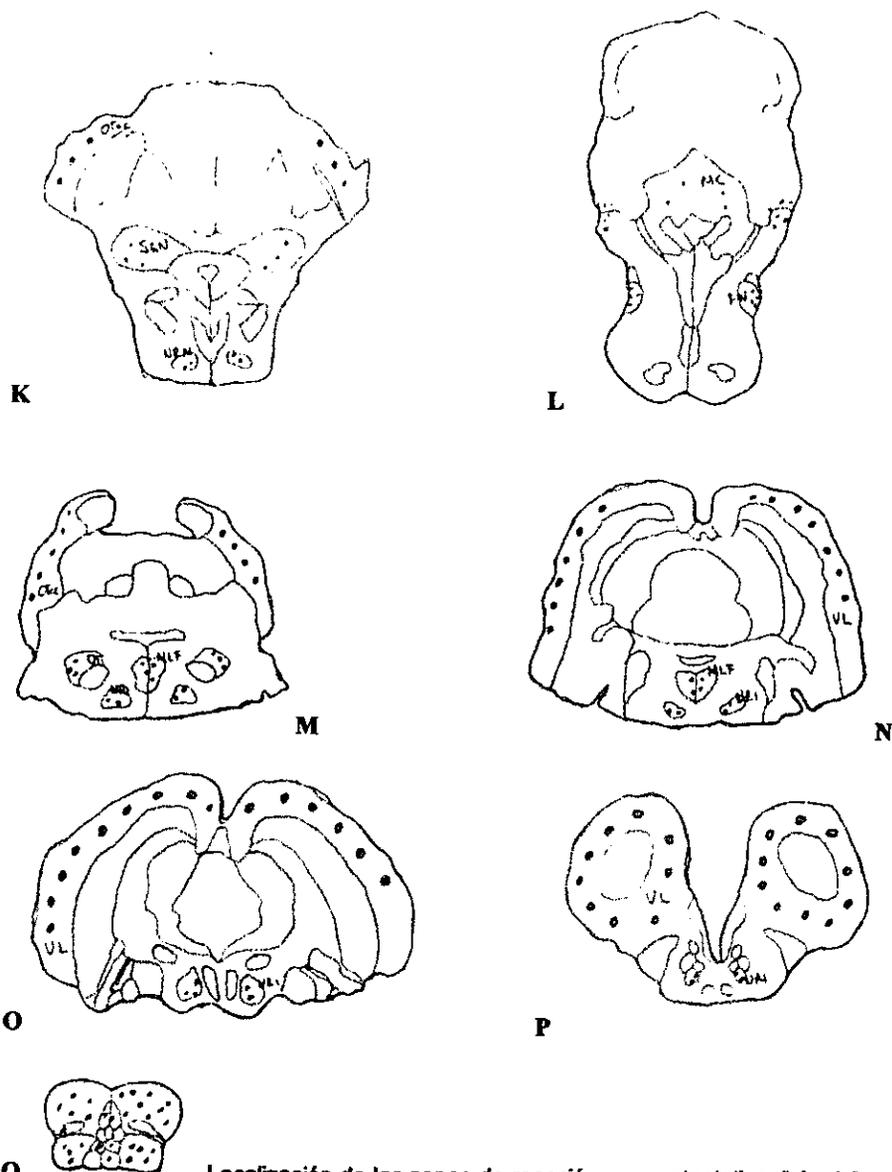
Diagrama que ilustra la metodología empleada en la distribución de somatostatina en encéfalo de pez dorado *Carassius auratus*.

RESULTADOS

La distribución de la inmunoreacción a somatostatina, en el encéfalo de pez dorado *Carassius auratus*, fue encontrada en las siguientes áreas: Cerebro anterior, área *ventralis telencéfalo pars ventralis* (Vv), área *ventralis lateralis* (VI), área *dorsalis medialis* (Dm), área *dorsalis centralis* (Dc), área *dorsalis lateralis* (DI), área *dorsalis dorsalis* (Dd), comisura anterior (Ac), tracto olfatorio (OIT), tracto óptico (OT), nervio óptico (ON), quiasma óptico (OC), núcleo *enteropendecularis* (NE), núcleo *preóptico periventricularis* (NPP), núcleo *anterioris periventricularis* (NAPv), núcleo *lateralis tuberis pars posterioris* (NLTp), núcleo *diffusus toris lateralis* (NDTL), núcleo tenia (NT), núcleo *preglomeruloso pars medialis comisuralis* (NPGc). Cerebro medio, tectum óptico (O Tec), tegmento del cerebro medio (MT), células de Mauthner (MC). Cerebro posterior, cerebelo (C), núcleo *reticularis superioris* (NRS), núcleo gustatorio secundario (SGN), núcleo *reticularis inferioris* (NRI) con una importante presencia, núcleo *reticularis medialis* (NRM), tracto trigémino (DT), *fascículos longitudinales medialis* (MLF), nervio facial (FN) y lóbulo vago (VL) con una presencia importante de inmunoreacción en el encéfalo. Así como la presencia en fibras de todo el encéfalo con una mayor proporción en cerebro medio y posterior.







Q Localización de las zonas de reacción a somatostatina, "círculo" en el esquema, intervalos entre los esquemas: A-B = 300 μ m; B-C = 300 μ m; C-D = 200 μ m; D-E = 400 μ m; E-F = 200 μ m; F-G = 200 μ m; G-H = 600 μ m; H-I = 1000 μ m; I-J = 360 μ m; J-K = 120 μ m; K-L = 360 μ m; L-M = 840 μ m; M-N = 240 μ m; N-O = 700 μ m; O-P = 700 μ m; P-Q = 500 μ m (Modificado de Pikavance, *et al.*, 1992)

OBSERVACIONES EN EL MICROSCOPIO



Distribución de inmunoreacción a somatostatina en encéfalo de *Carassius auratus*; **A** cerebro posterior 400X, **B** cerebro medio 400X, **C** fibras inmunoreactivas en cerebro medio 1000X, **D** inmunoreacción en la periferia de cerebro medio 500X, **E** inmunoreacción en cerebro posterior 40X, **F** cerebro medio 160X. Contratinción con Hematoxilina de Mayer.

Distribución de inmunoreacción a somatostatina, en encéfalo de pez dorado *Carassius auratus* A) encéfalo anterior, 160X. B) encéfalo anterior, 160X. C) encéfalo medio, tectum óptico, 160X. D) encéfalo posterior, cerebelo, 160X. E) encéfalo posterior, cerebelo, 400X. F) encéfalo posterior, lóbulo vago, 160X. Contraintinción con Hematoxilina de Mayer.



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran la presencia de somatostatina tanto en núcleos, como en fibras demostrando el importante papel de esta molécula en el encéfalo, ya que se le han atribuido funciones de neurotransmisor y neuromodulador en el SNC (Patel y Srikant, 1997., Reisine y Bell, 1995). La somatostatina es un potente inhibidor de la secreción basal e inducida de la GH en una gran variedad de mamíferos y peces. Contrariamente a lo reportado por Finley *et al.*, (1981) y Johanson *et al.*, (1984) quienes no encontraron inmunoreacción a somatostatina en el cerebelo de rata adulta, el presente trabajo reporta la presencia de somatostatina en el cerebelo de pez dorado, mostrando de esta forma una diferencia entre teleosteos y mamíferos.

En peces, la distribución de fibras y neuronas inmunoreactivas a somatostatina se ha detectado en células periféricas, en el núcleo *anterioris paraventricularis* que delimita el III ventrículo, de especies como *Anguilla anguilla*, *Phoxinus phoxinus* y *Salmo garidner* (Vigh- Teichman *et al.*, 1983).

Los niveles altos de reacción a somatostatina se han encontrado en el telencéfalo, en especial para el hipotálamo, tálamo y corteza cerebral en el mes de Noviembre (Marchant *et al.*, 1986). Estos resultados sugieren variaciones temporales de GH que son reflejo en la secreción de somatostatina.

Dubois *et al.*, (1979) como otros autores; (Kah *et al.*, 1982, Olivereau *et al.*, 1989, Batten *et al.*, 1985, Sas y Maler., 1991), han descrito la distribución de somatostatina en el diencéfalo de varios teleosteos incluyendo al pez dorado. En el encéfalo de pez dorado, los resultados muestran una coincidencia en los núcleos inmunoreactivos a SS con respecto a estudios realizados por Dubois *et al.*, (1979), quienes reportan la presencia de SS en los núcleos preóptico paraventricular (NPP) de trucha arcoiris; Olivereau *et al.*, (1984) reporta inmunoreactividad a SS en núcleos como: núcleo preóptico paraventricular de diferentes teleosteos entre ellos *Salmo irideus*, *Salmo fario*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus keta*, *Mugil ramada*, *Myoxocephalus octodecimspinosus*, *Colisa lalia*, *Anguilla anguilla*. En el estudio realizado por Kah *et al.*, (1982) en el encéfalo anterior de Ciprinidos, *Carassius auratus* y

Gambusia sp. localizaron la reacción a somatostatina en el núcleo preóptico periventricular. Estos datos junto con los obtenidos en el presente trabajo, nos muestran el significativo papel que juega en esta región hipotalámica, reguladora de la secreción de GH en la hipófisis.

Los efectos inhibitorios de la somatostatina 14 en la secreción de GH son evidentes en vertebrados inferiores, incluyendo teleósteos (Conlon, 1990; Harvey, 1993). La aplicación de somatostatina 14 reduce la secreción de GH tanto *in vitro* como *in vivo* de muchas especies de teleósteos, incluida la tilapia (Helves *et al.*, 1987; Melamed *et al.*, 1995, 1996), trucha arcoiris (Luo *et al.*, 1990; Pérez Sánchez *et al.*, 1992; Holloway *et al.*, 1997), salmón coho (Sweeting y Mckewn, 1986), carpa común (Lin *et al.*, 1993), y pez dorado (Cook y Peter, 1984; Marchant *et al.*, 1987).

Destaca como único reporte del encéfalo completo para *Carassius auratus*, el realizado por Pikavance *et al.*, (1992), cuyo trabajo también localizó al neuropéptido Y (NPY) por medio de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia para SS. Encontró que ambos péptidos tienen una distribución muy semejante con una presencia de fibras inmunoreactivas en todo el encéfalo de pez dorado. Nuestro trabajo encuentra coincidencias, siendo las siguientes; el área *ventralis lateralis* (VI), núcleo entopendecular (NE), área *dorsalis centralis* (Dc), núcleo *preóptico paraventricularis* (NPP), núcleo *anterioris paraventricularis* (NAPv), tectum óptico (O Tec), núcleo gustativo secundario (SGN), lóbulo facial y lóbulo vago (VL). Los datos reportados por Pikavance *et al.*, (1992) no especifican el sexo del organismo ni en qué etapa del ciclo reproductivo se encuentra, es por ello que en el presente trabajo al identificar algunas de las áreas reportadas por Pikavance *et al.*, (1992) podemos mencionar que en recrudescencia la somatostatina se encuentra en estas áreas, con una mayor presencia de fibras positivas en O Tec, SGN, VL y lóbulo facial. Aunque no todas las áreas con inmunoreacción reportadas en el presente trabajo tuvieron una constancia respecto a los autores previos (Dubois *et al.*, 1992; Kah *et al.*, 1982; Olivereau *et al.*, 1984; Batten *et al.*, 1985; Sas y Maler, 1991).

En cerebro anterior: las áreas *ventralis* del telencéfalo *pars ventralis*, *dorsalis medialis*, *dorsalis lateralis*, *dorsalis dorsalis*, así como en comisura anterior, el nervio óptico, quiasma óptico, los núcleos *entopendecularis*, *lateral tubercis pars posterioris*, *diffusus toris lateralis*, tenia, preglomeruloso *pars medialis comisuralis*. Para cerebro medio, tegmento del cerebro medio, células de Mauthner. En cerebro posterior, cerebelo, los núcleos *reticularis inferioris*, *reticularis medialis* y el tracto trigémino, fascículos longitudinales *medialis* y nervio facial. Estos datos colaboran al tratar de entender de una manera más específica la acción de este tetradecapéptido SS-14 en las zonas localizadas con un anticuerpo específico para el, en la etapa de recrudescencia, ratificando una importante función en el hipotálamo – hipófisis, la cual se encuentra involucrada en la regulación de la secreción de hormonas a partir de la hipófisis (Rao *et al*, 1982). Cerebro posterior, el tracto mesencéfalo cerebelar el cual sirve para la transmisión de la información del tectum óptico al cerebelo (Sarnat y Netsky, 1973), una presencia de SS en el lóbulo vago y facial involucradas en la información vicero-sensorial (Kah *et al*, 1982).

La regulación neuroendocrina de la secreción de GH en el pez dorado como en otras especies es multifactorial. Un balance entre la estimulación y la acción inhibitoria de neurohormonas en las células somatotropas (Peter y Marchant, 1995; Peng y Peter, 1997). La somatostatina (SS ó SRIF) es el primer inhibidor basal de la secreción de GH, norepinefrina (NE), serotonina (5-HT) y glutamato también tienen acción inhibitoria sobre la secreción de GH. La secreción de GH es estimulada por el factor estimulante de la hormona de crecimiento (GRF), en la hipófisis el polipéptido adenil-ciclasa (PACAP), hormona gonadotrópica (GnRH), dopamina (DA), neuropeptido Y (NPY), hormona estimuladora de la tiroides (TRH), colecistoquinina (CCK), bombesina (BBS) y activina (Peter y Chang, 1999) (Fig. 5).

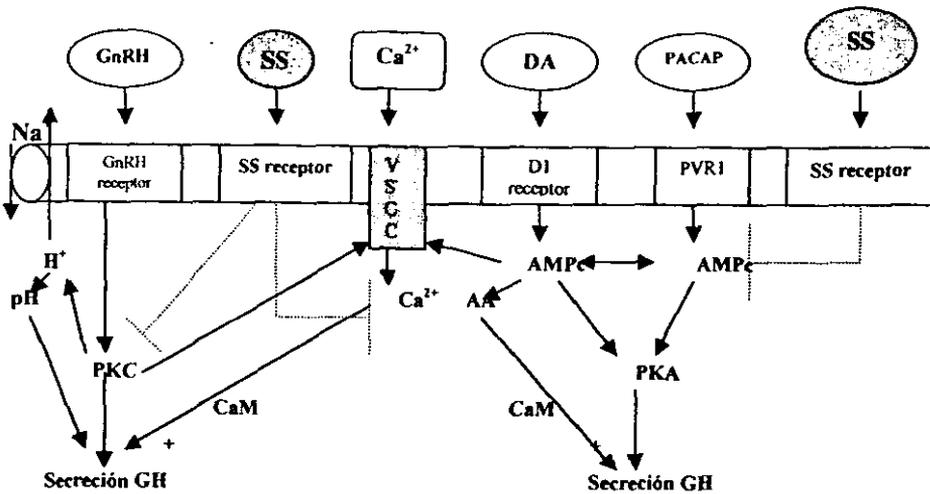


Fig. 5. Diagrama que ilustra los mecanismos de transducción mediados por la regulación neuroendocrina en la secreción de GH por GnRH, DA, PACAP y SS en pez dorado. La secreción de GH puede tomar dos vías por la proteína quinasa (PKC) o por los receptores sensibles de AMPc/PKA. La GnRH utiliza los mecanismos dependientes de PKC; en contraste, la DA utiliza la vía receptores D1 y la PACAP la vía de receptores tipo 1 (PVR1) activando los mecanismos sensibles AMPc/PKA. La activación de PKC y el AMPc incrementa la cantidad extracelular de Ca^{2+} entrando por los canales sensibles a voltaje de Ca^{2+} (VSCC), donde se le agrega la enzima calmodulín (CaM), la estimulación de la PKC es activada por Na^+/H^+ por el sistema antipuerta que afecta el pH intracelular, las áreas dependientes de AMPc utilizan para moverse el ácido araquínico (AA). La acción de la somatostatina es mediada por la inhibición de PKC, AMPc y Ca^{2+} dependientes de la secreción de GH (Modificado de Peter y Chang, 1999).

Junto con otros factores neuroendocrinos, la información disponible en pez dorado de los factores estimuladores predominantes en regresión sexual es la DA, CCK y GRF. En madurez sexual GnRH, NPY y TRH son los factores predominantes. La evidencia experimental indica que en el SNC el control de la secreción de GH desde la hipófisis es activado por un delicado sistema entre hormonas hipotálamicas siendo dos las más importantes, la hormona estimulante de la hormona de crecimiento (GHRH ó GRF) y su contraparte la hormona inhibitoria, la somatostatina (SS ó SRIF) (Fig. 6).

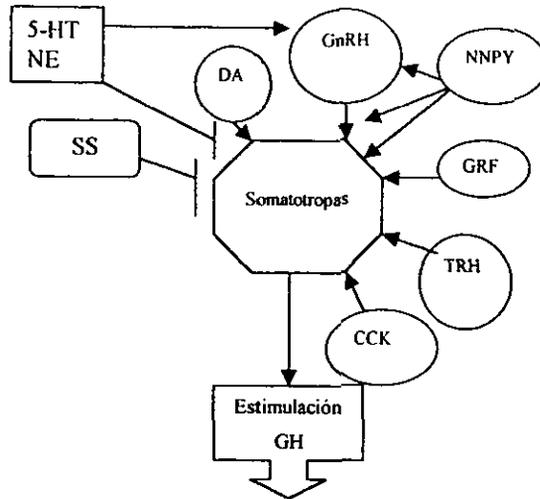


Fig. 6. Modelo neuroendocrino multifactorial de la hormona de crecimiento (GH) en pez dorado y carpas, (\blacktriangledown) estimulación, (\perp) Inhibición, abreviaciones; colecistoquinina, CCK; dopamina, DA; Factor estimulador de la GH, GRF; hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH; Neuropeptido Y; norepinefrina, NE; serotonina, 5-HT; Somatostatina, SS o SRIF; hormona estimuladora de la tiroides, TRH (Modificado de Peter y Marchant, 1995).

La estimulación de la secreción de GH por GRF en teleosteos ha sido establecido por Peng y Peter, (1997). Las neuronas con GRF se han encontrado distribuidas en el núcleo *tuberis lateralis* y núcleo preóptico en el hipotálamo; el GRF se proyecta en la *pars distalis* por la vía nerviosa de la hipófisis (Marivoet *et al.*, 199; Luo y Mckewon, 1989). La reacción en núcleos como en fibras se ha localizado en, núcleo preóptico y la región ventrobasal del hipotálamo en el pez dorado usando un anticuerpo específico para GRF (Rao *et al.*, 1996), núcleo preóptico y núcleo preóptico *periventricularis* y fibras nerviosas que llegan hasta la hipófisis esto en pez dorado como en carpas (Olivereau *et al.*, 1984).

En teleosteos, el NLT inerva a la hipófisis (Peter *et al.*, 1990; Anglade *et al.*, 1993; Prasada Rao *et al.*, 1993), contiene células inmunoreactivas a hormona estimulante de la hormona gonadotrópica (GnRH) (Kah *et al.*, 1986), somatostatina y otros péptidos (Peter, 1986), cuerpos celulares inmunoreactivos fueron localizados entre el nervio olfativo y el bulbo olfatorio, en el tracto olfatorio, la parte ventral del telencéfalo, el núcleo preóptico

parvicellularis anterioris y el hipotálamo ventrolateral con una presencia de fibras en todo el encéfalo inmunoreactivas a GnRH con una mayor presencia en cerebro anterior y tectum óptico de *Carassius auratus* (Kim *et al*, 1995).

La inmunoreacción para la hormona liberadora de crecimiento (GHRH), fue descrita por Rao *et al*, (1996) en el núcleo preóptico periventricular (NPP), núcleo lateralis tuberis (NLT), núcleo lateral del lemnisco (NLL) y la glándula pineal. En el área preóptica y área ventralis del telencéfalo que recibe la inervación desde las células del NPP. Las fibras que salen del NLT se extienden caudalmente a lo largo del piso infundibular que inerva a la hipófisis. La inervación en el hipotálamo encontrándose GHRH en NLL tiene influencia sobre los procesos de alimentación. La presencia de GHRH en la glándula pineal (glándula que secreta melatonina) se cree que tiene relación con el ciclo día – noche del organismo (Rao *et al*, 1996) en pez dorado encontramos somatostatina en fibras del NPP posiblemente en esta etapa de recrudescencia regulando la secreción de GHRH.

La presencia de células inmunoreactivas a GHRH en el NPP, presumiblemente envuelto en la estimulación y liberación de la GH. Se conoce que el NPP inerva a la hipófisis (Kah *et al*, 1987; Anglade *et al*, 1993; Prasada Rao *et al*, 1993), fibras con inmunoreacción a GHRH aparentemente provenientes del NPP extendidas rostralmente e inervadas en el área ventralis del telencéfalo. La parte ventromedial del telencéfalo ha sido identificada en la regulación de la alimentación (Demski, 1983) y la regulación del desove (Kyle *et al*, 1982) en teleósteos.

En varios teleósteos el NPP se ha observado con dopamina (DA) (Kah *et al*, 1988), galanina (Cornbrooks y Parsons, 1991., Olivereau y Olivereau, 1991) y somatostatina (Sas y Maler, 1991., Pikavance *et al*, 1992., Kah *et al*, 1982., Dubois *et al*, 1979) en el presente trabajo también se identificó inmunoreacción en esta área para SS en fibras posiblemente en una función moduladora de esta área.

Las células somatotropas son sensibles a los factores neuroendocrinos que son influenciados por los esteroides sexuales. La acción estimuladora de la DA en la secreción de GH varía de acuerdo a las estaciones del ciclo reproductivo, una alta existencia de DA en regresión, intermedia en recrudescencia y baja en madurez (Wong *et al*, 1993). En el NPP juega un papel en la inhibición de la secreción de la GH por la activación del receptor D1 en las células somatotropas (Wong *et al.*, 1993, 1994).

La primera demostración del receptor D1 en hipófisis de vertebrados. Por medio de estudios autoradiográficos revelaron que el sitio de unión D1 específico se encuentra localizado en la *pars proximalis distalis* de la hipófisis en pez dorado donde se localizan las células somatotropas (Wong *et al*, 1993) estos datos dan soporte que el receptor D1 y la DA regulan la secreción de GH.

Otro factor neuroendocrino importante es el NPY al cual se le reconocen funciones como neuromodulador y neurotransmisor, en adición a esto se le reconocen funciones neuroendocrinas en la regulación y secreción de hormonas en la hipófisis en mamíferos como en otros vertebrados (Kah *et al.*, 1989; Pau *et al.*, 1989). La inmunoreacción a NPY fue observada por Pikavance *et al*, (1992) en pez dorado en, NPP, NPO y NLTI con las mismas funciones de neuromodulador y neurotransmisor (Pontet *et al*, 1989). Se han observado fibras en la *pars distalis* y en el lóbulo neurointermedio de la hipófisis de pez dorado, pero no se encontró NPY en el hipotálamo.

Una alta colocalización de NPY y SS en el área dorsal del telencéfalo sugiere una conexión neuronal desde VI a Dc (Pikavance *et al*, 1992). En el cerebro anterior de mamíferos, las neuronas con inmunoreacción a SS y NPY fueron localizadas en el cuerpo estriado, cortex cerebral y regiones ventrales del hipocampo (Vincent *et al*, 1982, 1983; Staines *et al*, 1988).

La presencia de SS en los núcleos, NPO y NLTI sugieren una función reguladora en el área hipotalámica, además de presentar una inervación neurosecretora en la hipófisis (Fryer y Maler, 1981) se han encontrado fibras positivas a SS con una inervación directa en la adenohipófisis de pez, oveja, cerdo, rata (Dubois *et al.*, 1977).

La colocación de SS y NPY en el área de *torus semicircularis* (TS) sugiere que la neuronas se proyectan al tectum óptico (Finger y Tong, 1984), también fueron encontrados en los sistemas faciales donde ocurren los procesos de selección de comida y deglución (Finger, 1988), en pez dorado en recrudescencia se encontró inmunoreacción a somatostatina en estas áreas.

La localización en el tracto trigémino de SS y NPY, de la cual media las sensaciones táctiles a la cabeza (Puzdrowski, 1988). La localización de SS en el cerebelo juega un papel modulador en los procesos del tono muscular en el animal, reflejos, la integración visual, acústica y quizá en la estimulación del gusto. En el haz mesencéfalo-cerebeloso mostró una presencia de SS en relación a lo reportado para su receptor por Cárdenas *et al.*, (2000). Dado que este haz es una vía de impulsos entre el techo óptico y el cerebelo (Sarnat y Netsky, 1976), es probable que se utilice esta ruta como auxiliar en el control de movimientos corporales, una vez que la información procedente del exterior fue procesada en el techo óptico, se envíe al cerebelo encargado de coordinar los movimientos corporales que resulten más adecuados para el organismo de acuerdo a los factores externos, como pudieran ser: la presencia de alimento, las presencia de depredadores o alguna otra amenaza (Cárdenas, 1998). Una de las estructuras más desarrolladas en el encéfalo de peces es el techo óptico. Cuando esta parte anatómica del encéfalo de peces es comparada con su homóloga en cualquier otro vertebrado, el techo óptico de teleósteos muestra claramente la importancia que ha cobrado en estos organismos. Además de la función general de coordinación visual, otras funciones han sido atribuidas a dicha estructura en peces. Entre ellas encontramos la correlación con otras vías exteroceptivas, donde después del análisis de la información se emite una respuesta. Es por ello que no resulta sorprendente que en el techo óptico se registre una abundancia de receptores a somatostatina (Cárdenas *et al.*, 2000), presentando una significativa correlación con el péptido.

En el caso de los lóbulos vagos, concuerdan con los reportados por Pikavance *et al.*, (1992) con el neuropéptido y por los datos reportados para su receptor (Cárdenas *et al.*, 2000). Indiscutiblemente existe una marcada influencia de esta neurohormona en el sentido del gusto, tanto a nivel palatino como a niveles de branquias y papilas gustativas ubicadas en la piel, pues es bien sabido que entre los vertebrados, es en teleósteo donde se presentan la mayor sensibilidad al sentido del gusto y es en dicha zona del encéfalo donde se controla esta sensación (Cárdenas, 1998).

La presencia de receptores en el encéfalo, reportados por Cárdenas *et al.*, (2000) establecen la distribución de receptores para somatostatina 14, en todo el encéfalo de pez dorado *Carassius auratus*, encontrando en todo el encéfalo receptores. Donde observamos una correlación del receptor por la cantidad de receptores identificados, con el tetradecapéptido (SS-14) localizados por el presente trabajo fue en: núcleo preóptico *paraventricularis* (NPP), Tectum óptico (O Tec), lóbulo vago (VL), las siguientes áreas no fueron reportadas por Cárdenas *et al.*, (2000), por una presencia significativa de receptores a SS-14, núcleo *anterioris periventricularis* (NAPv), núcleo entopendecular (NE), área *ventralis lateralis* (VI), núcleo dorsocentral del telencéfalo (Dc), área *dorsalis telencéfalo pars medialis* (Dm), área *dorsalis telencéfalo pars lateralis* (Dl), tracto olfatorio (OIT), tejidos conectivos (CT), núcleo tenia (NT), núcleo *preglomeruloso pars medialis comisuralis* (NPGc), núcleo gustatorio secundario (SGN), nervio óptico (ON), quiasma óptico (OC), células de Mauthner (MC), fascículos *longitudinalis medialis* (MLF), tracto óptico (OT), núcleo *lateralis tuberis pars posterioris* (NLTp), núcleo *reticularis medialis* (NRM), áreas que fueron encontradas en el presente trabajo, lo que nos indica que no necesariamente existe una correlación con el receptor posiblemente.

Las variaciones temporales de cantidad de somatostatina fueron observadas en diferentes modelos experimentales tanto en hembras como en machos (Marchant *et al.*, 1986). El ciclo reproductivo del pez dorado es por temporadas, en lo que a concentraciones de hormona de crecimiento (GH) en suero respecta, presenta niveles altos en la preovulación, hasta después del período de ovulación, ya que los niveles bajos de GH ocurren en la regresión sexual del pez, en verano y otoño (Marchant *et al.*, 1989).

Lin *et al.*, (1999), revela tres formas de SS a partir de cDNAs aisladas del cerebro de pez dorado, los cuales codifican para tres prepro-somatostatina (PSS) designados como PSS-I, PSS-II y PSS-III las cuales codifican para SS-14, SS-28 y una variante de SS-14 respectivamente.

En pez dorado los niveles son altos para PSS-II y PSS-III en machos como para hembras en el mes de Julio cuando están en regresión, los niveles bajos los encontramos en el mes de Abril cuando están sexualmente maduros. Lo cual nos indica que las variaciones de RNAm de PSS-II y PSS-III en sus niveles, no necesariamente tienen una correlación en las variaciones temporales de GH (Marchant *et al.*, 1986, 1989).

Datos obtenidos por Lin *et al.*, (1999) demuestran que los niveles altos de RNAm para PSS-I del pez dorado fueron registrados en madurez sexual en el mes de Abril y en recrudescencia en el mes de Diciembre ya que en el mes de Julio cuando la gónada esta en regresión fueron bajos al igual que machos (Tabla 2). El presente trabajo realizado en hembras en la etapa de recrudescencia, Diciembre, describe una gran variedad de áreas y fibras inmunoreactivas a SS posiblemente por la gran presencia de PSS-I en cerebro anterior del encéfalo de *Carassius auratus* reportado por Lin *et al.*, (1999), como de la variante PSS-III, en lo que el anticuerpo posiblemente lo identifique como PSS-I al no notar la variación de los aminoácidos, es por lo que se sugiere realizar mas estudios de tipo hibridación *in situ* en el encéfalo para demostrar de manera mas explicita la presencia y áreas localizadas de SS-14 en *Carassius auratus*.

PSS-I	MADUREZ	REGRESIÓN	RECRUDESCENCIA
	ABRIL	JULIO	DICIEMBRE
Machos	Concentración baja	Concentración baja	Concentración baja
Hembras	Concentración alta	Concentración baja	Concentración alta

Tabla. 2. Concentraciones de PSS-I tanto en machos como en hembras de *Carassius auratus* (Modificado de Lin *et al.*, 1999).

Los niveles altos de RNAm de PSS-I del pez dorado, lo notaron en la madurez sexual en el mes de Abril y en recrudescencia en el mes de Diciembre, niveles bajos de PSS-I en regresión sexual en el mes de Julio. Las diferencias entre machos y hembras en la expresión de RNAm de PSS-I implica para ambos que los esteroides sexuales modulan la expresión de RNAm de PSS-I en el pez dorado (Lin *et al*, 1999).

Los niveles de GH en suero durante la madurez sexual y posterior al desove son altos y bajos en regresión sexual en otoño, en pez dorado (Marchant y Peter, 1986., Marchant *et al*, 1989). Los esteroides sexuales, en particular el estradiol, parecen influir en la cantidad de secreción basal de GH. Las concentraciones de somatostatina 14 en varias regiones del encéfalo de pez dorado, varían de acuerdo a las variaciones en el ciclo reproductivo esto es inverso a las concentraciones de GH que son reflejo de los cambios en la intensidad de la SS-14 en su inhibición (Marchant *et al*, 1989).

Estudios previos, demuestran que las variaciones temporales en la circulación de GH del pez dorado, se observa un nivel alto en el mes de Junio y un nivel bajo en el mes de Noviembre (Marchant y Peter, 1986). Las variaciones en el crecimiento del pez dorado se encuentra en correlación en parte por el ciclo en los niveles de GH en suero (Marchant *et al*, 1989).

Las técnicas de mantenimiento, crecimiento y reproducción de los peces han ido cobrando importancia y se ha pasado de técnicas en las cuales se mantenía a las especies y tan sólo se extraía una parte de su población, permitiendo que el resto de la misma continuara con su ciclo natural, a otras en las que se aplica el control de los factores ambientales, el manejo del ciclo de crecimiento y/o reproductivo, y más recientemente la aplicación de sustancias que promueven el crecimiento o la reproducción de la especie. Uno de estos aspectos básicos que debe conocerse para la mejor explotación de los peces es su endocrinología (Cárdenas, 1996). En el presente trabajo encontramos una gran variedad de áreas de inmunoreacción a somatostatina en este periodo de recrudescencia cuyos datos concuerdan en la presencia de SS-14 por autores previos, con los reportados para su RNAm (PSS-I), en cerebro anterior de esta época del año, e inversas a las concentraciones de GH en suero

reportadas para pez dorado, siendo Diciembre el mes de su sacrificio, de los cuales en áreas como: el tracto mesencéfalo-cerebelar, el tectum óptico, los lóbulos vagos y faciales encuentran una relación estrecha con su receptor en las funciones de la transmisión de la información del tectum óptico al cerebelo, integración de la información visual y en la regulación de la ingestión respectivamente.

CONCLUSIONES

En la etapa de recrudescencia de pez dorado hembra, se encontraron las siguientes áreas; *Cerebro anterior*, área *ventralis telencéfalo pars ventralis* (Vv), área *ventralis lateralis* (VI), área *dorsalis medialis* (Dm), área *dorsalis centralis* (Dc), área *dorsalis lateralis* (DI), área *dorsalis dorsalis* (Dd), comisura anterior (Ac), tracto olfatorio (OIT), tracto óptico (OT), nervio óptico (ON), quiasma óptico (OC), núcleo *enteropendecularis* (NE), núcleo preóptico *periventricularis* (NPP), núcleo *anterioris periventricularis* (NAPv), núcleo *lateral tuberis pars posterioris* (NLTp), núcleo *diffusus toris lateralis* (NDTL), núcleo *tenia* (NT), núcleo *preglomeruloso pars medialis comisuralis* (NPGc). *Cerebro medio*, tectum óptico (O Tec), tegmento del cerebro medio (MT), células de Mauthner (MC). *Cerebro posterior*, cerebelo (C), núcleo *reticularis superioris* (NRS), núcleo *gustatorio secundario* (SGN), núcleo *reticularis inferioris* (NRI), núcleo *reticularis medialis* (NRM), tracto trigémino (DT), *fascículos longitudinales medialis* (MLF), nervio facial (FN) y lóbulo vago (VL). Así como la presencia en fibras de todo el encéfalo con una mayor proporción en cerebro medio y posterior.

APÉNDICE

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- somatostatina de conejo (1:100) por 24 hrs. 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 hrs.
8. Lavar 2 veces con PBS 1:3.
9. Revelar con una solución sustrato de Diaminobencidina- H₂O₂ al 30% por 5 minutos aproximadamente o hasta que genere color. Detener la reacción en PBS 1:3 y realizar 4 lavados.
10. Sé contratífe 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 3min.
13. Finalmente montar con resina y observar al microscopio.

Índice gonadosomático

La identificación del ciclo reproductivo se realizó en base al índice gónada somático y la observación directa de las gónadas, con relación al peso y tamaño del organismo.

Las cuales presentaban características morfológicas para esta etapa del ciclo reproductivo.

Los resultados obtenidos mostraron un índice gónada somático (IGS) entre 2 y 6% de las hembras estudiadas en este estudio.

IGS = 100 X peso de la gónada / peso corporal. (Carl B. Schreck, and Peter B. Moyle, 1990. *Methods for fish Biology*, USA. pp-372)

BIBLIOGRAFÍA

Aida K, A. (1988). Review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fish. *Aquaculture*; 74: 11-21.

Andrews, P.C., Pollock, H. G., Elliot, W.M., Youson, J.H., Plisetskaya, E.M. (1988). Isolation and characterization of a variant somatostatin-14 and two related somatostatins of 34 and 37 residues from lamprey (*Petromyzon marinus*). *J.Biol. Chem.* 263, 15809-15814.

Andrews, P.C., Pubols, M.N., Hermodson, M.A., Sheares, B.T., Dixon, J.E., (1984). Structure of the 22-residues somatostatin from catfish. An O-glycosylated peptide having multiple forms. *J.Biol. Chem.* 259: 13267-13272.

Anglade, I., Zandbergen, A. M., Kah, O, (1993). Origen of the pituitary innervation in the goldfish. *Cell Tissue Res.* 273, 345-355.

Blázquez, P. T. Bosma, E. J. Fraser, K. J. W. Van Look, V. L. Trudeau, (1997). Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 119, 345-364.

Brazeau, P, Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, R., (1973) A hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79.

Cárdenas R.R. (1998). Distribución de receptores a somatostatina en encéfalo de pez dorado. Tesis, M en C, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.

Cárdenas, R., Lin, X.W., Chávez, M., Aramburo, C., Peter, R.E., (2000). Characterization and distribution of somatostatin binding sites in goldfish brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117: 117-128.

Cárdenas, R.R. (1996). Regulación endocrina de la reproducción y el crecimiento en peces óseos. *Ciencia y Desarrollo*. Pg. 22-28.

Chung Peng, Richard E. Peter. (1997). Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone and Growth in Fish. *Zoological Studies*. 36 (2): 79-89.

Conlon, J.M. (1990). Somatostatin: Aspects of molecular evolution. In "Progress in Comparative Endocrinology" (A. Epple, C.G. Scanes, and M.H. Stetson, Eds.), pp.10-15. Wiley-Liss, New York.

Conlon, J.M., Hicks, J.W. (1990). Isolation and primary structures of insulin, glucagons and somatostatin from the turtle. *Pseudemys scripta*. *Peptides* 11, 461-466.

Conlon, J.M., Bondareva, V., Rusakov, Y., Plisetskaya, E.M., Mynarcik, D. C., Whittaker, J. (1995). Characterization of insulin, glucagons and somatostatin from the river lamprey, *Lampreru fluviialis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100, 96-105.

Conlon, J.M., Deacon, C.F., Hazon, N., Henderson, I.W., Thim, L. (1988). Somatostatin-related and glucagons-related peptides with unusual structural features from the European eel (*Anguilla anguilla*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 72,181-189.

Conlon, J.M., Tostivint, H., Vaudry, H. (1997). Somatostatin – and urotensin II-related peptides: Molecular diversity and evolutionary perspectives. *Regul. Pept.* 69, 95-103.

Cook, A.F. R.E.Peter, 1984. Effects of somatostatin on serum growth hormone levels in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54, 109-113.

Combrooks, E. B., Parsons, R.L. (1991). Source of sexually dimorphic galanin-like immunoreactive projection in the teleost fish *Poecilia latipinna*. *J. Comp. Neurol.* 304, 658-665.

Demski, L.S. (1993). Behavioral effects of electrical stimulation of the brain. In "Fish Neurobiology, Vol. 2, Higher Brain Areas and Functions" (R.E. Davis and R.G. Northcutt, Eds.), pp. 317-359. The University of Michigan Press, Ann Arbor, MI.

Dubois, M. P., Billard, R., Breton, B. Peter, R.E., (1979) Comparative distribution of somatostatin, LHRH, neurophysin, and β -endorphin in the rainbow trout: An immunocytological study. *Gen. Comp. Endocrinol.* 37: 220-232.

Elson, C. O., Holland, S.P., Dertzbaugh, M.T., Cuff, C.F., Anderson, A.O. (1995). Morphologic and functional alterations of mucosal T cells by cholera toxin and Hs B subunit 1. *The Journal of immunology.* 154: 1032-1040.

Finger, T. E. (1988). Sensorimotor mapping and oropharyngeal reflexes in goldfish, *Carassius auratus*. *Brain Behav. Evol.* 31, 17-24.

Finger, T. E. Tong, S.- L. (1984). Central organization of eighth nerve and mechanosensory lateral line systems in the brainstem of Ictalurid catfish, *J. Comp. Neurol.* 229, 129-151.

Finley JCW, Maderdrut J.L. Roger L.J. Petrusz P (1981) The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 6: 2173-2192.

Fryer, J. N., Maler, L. (1981). Hypophysiotropic neurons in the goldfish hypothalamus demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Cell Tissue Res.* 218, 93-102.

Grau, E. G., Helms, L.M.H. (1989). The tilapia prolactin cell: A model for stimulus-secretion coupling. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 11-19.

Habibi HR, DeLeeuw R, Nahorniak CS, Goos HJTH, Peter RE. (1989). Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish: seasonal and gonadal effects. *Fish Physiol Biochem* 7: 109-118.

Harvey, S. (1993). Growth hormone secretion in poikilotherms and homeotherms. In "The Endocrinology of Growth, Development, and Metabolism in Vertebrates" (M.P. Schreibman, C.G. Scanes, and P.K. T. Pang, Eds.), pp. 151-182. Academic Press, New York.

Hellman B, Lernmark A (1969) Inhibition of the *in vitro* secretion of insulin by an extract of pancreatic α_1 cells. *Endocrinology* 84: 1484-1487.

Helms, L.M., Grau, E.G., Shimoda, S.K., Nishioka, R.S., Bern, H.A. (1987). Studies on the regulation of growth hormone release from the *proximal pars distalis* of male tilapia, *Oreochromis mossambicus*, *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 65-48.

Holloway, A.C., Sheridan, M. A., Leatherndland, J, F, (1997). Estradiol inhibits plasma somatostatin 14 (SRIF-14) levels and inhibit the response of somatotrophic cells to SRIF-14 challenge *in vitro* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 407-414.

Jerald J. Berstein. (1970). The nerves system, circulation and respiration. In fish Physiology, Academia Press NY.

Johanson O, Hokfel T, Elde RP (1984) Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neurosciencie* 13: 265-339.

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

Kah, O., Chambolle, P., Dubourg, P., Dubois, M. P., (1982) Localisation immunocytochimique de la somatostatina dans le cerveau anterior et l' hypophyse de dex téléostéens, le cyprin (*Carassius auratus*) et *Gambusia sp.* C.R. Acad. Sc. Paris t. 294 (III): 519-524.

Kah, O., Dubourg, P., Onteniente, B., Geffard, M., Calas, A (1986). The dopaminergic innervation of the goldfish pituitary: An immunocytochemical study at the electron-microscope level using antibodies against dopamine. *Cell Tissue Res.* 244, 577-582.

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

Kha, O., Dulka, J. G., Dubourg, P., Thibault, Peter, R.E (1987). Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotrophin secretion in goldfish: Existence of a dopaminergic preoptic-hypophyseal pathway. *Neuroendocrinology* 45, 451-458.

Kim, Myung-Hee, Oka. Y, Amano. M, Kobayashi. M, Okuzawa. K, Hasegawa. Y, Kawashima. S. Susuki. Y. Aida. K. (1995). Immunocytochemical Localization of sGnRH and cGnRH-II in the Brain of Goldfish, *Carassius auratus*. *The Journal of comparative neurology* 356: 72-82.

Krisch B (1979) Immunohistochemical results on the distribution of somatostatin in the hypothalamus and in limbic structures of the rat. *J Histochem Cytochem* 27: 1389-1390.

Krulich L. Dhariwal APS, McCann SM (1968) Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary *in vitro*. *Endocrinology* 83: 783 - 790.

Kyle, A.L., Stacey, N. E., Peter, R.E. (1982). Ventral telencephalic lesions: Effects on bisexual behavior, activity, and olfaction in male goldfish. *Behav. Neural Biol.* 36, 229-241.

Lamberts, S. W. J., Van der Lely, A. J., Herder, W. W., (1996) drug Therapy: octreotide. *N. Engl. J. Med.* 334: 246-254.

Lin, X., Janovicck, J.A., Cárdenas, R., Conn, M.P., Peter, R., (2000). Molecular cloning and expression of a type-two somatostatin receptor in goldfish brain and pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 166, 75-87.

Lin, X., Otto, C. J., Peter, R.E. (1998). Evolution of neuroendocrine peptide systems: Gonadotropin-releasing hormone and somatostatin. *Comp. Biochem. Physiol.* 119, 375-388.

Lin, X., Otto, C.J., Peter, R.E. (1999). Expression of three distinct somatostatin mRNAs in goldfish brain: Characterization of the cDNAs, distribution and seasonal variation of the mRNAs, and action of somatostatin-14 variant. *Endocrinology* 140, 5211-5219.

Luo D, BA Mckewon. (1989). An antioxidant dependent *in vitro* response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) somatotrophs to carp growth hormone-releasing hormone (GRF). *Horm. Metab. Res.* 21: 690-692.

Luo, D., McKeown B.A., (1991) Interaction of carp growth hormone-releasing factor and somatostatin *in vivo* release of growth hormone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Neuroendocrinology* 54: 359-364.

Luo, D., Mckewon, B.A., Rivier, J., Vale, W. (1990). *In vitro* responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatotrophs to carp growth hormone-releasing factor (GRF) and somatostatin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80, 288-298.

Marchant TA, JG Dulka, RE Peter, (1989). Relationship between serum growth hormone levels and the brain and pituitary content of immunoreactive somatostatin in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Gen. Comp. Endocrinol*, 73: 458-468.

Marchant TA, RE Peter, (1986). Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Exp. Zool.* 237: 231-239.

Marchant, T., Fraser, R.A., Andrews, P.C., Peter, R.E., (1987) The influence of mammalian and teleost somatostatin on the secretion of growth hormone from gold fish (*Carassius auratus*) pituitary fragments in vitro. *Regul. Pep.* 17: 41-52.

Marchant, T.A. Peter, R.E., (1986). Seasonal variations in body growth rates and circulating level of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. *J.Exp.Zool.*, 237: 231-239.

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

Marivoet, S., Moons, L, Vandesande, F (1988). Localization of growth hormone releasing factor-like immunoreactivity in the hypothalamo-hypophyseal system of the frog (*Rana temporaria*) and the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Com. Endocrinol.* 72, 72-79.

Melamed, P., Eliahu, N., Levai-Sivan, B., Ofir, M., Farchi-Pisanty, O., Rentier-Delrue, F., Smal., Yaron, Z., Naor, Z. (1995). Hypotalamic and thyroidal regulation of growth hormone in tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97, 13-30.

Melamed, P., Gur, G., Elizur, A., Rosenfeld, H., Sivan, B., Rentier-Delrue, F., Yaron, Z. (1996). Differential effects of gonadotropin-releasing hormone, dopamine and somatostatin and their second messengers on the RNAm levels of gonadotroping liß subuniti and growth hormone in the teleost fish, tilapia. *Neuroendocrinology* 64, 320-328.

Olivereau, M., Olivereau, J.M. (1991). Immunocytochemical localization of galanine- like peptidergic system in the brain and pituitary of some teleost fish. *Histochemistry* 96, 343-354.

Olivereau, M., Ollevier, F., Vandesande, F., Oliverau, J., (1984) Somatostatin in the brain and the pituitary of some teleost. *Cell Tissue Res.* 238: 289-296.

Olivereau, M., Ollivier, F., Vandesande, F., Verdonck, W., (1984) Immunocytochemical identification of CRF-like and SRIF-like peptides in the brain and the pituitary of cyprinid fish. *Cell Tissue Res.* 237: 379-382.

Patel, Y., (1992) General aspects of the biology and function of somatostatin. En: Basic and clinical aspects of neuroscience Vol. 4: somatostatin. Chapter 1. Springer Sandoz, Basel,

Patel, Y.C., Srikant, C.B. (1997). Somatostatin receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 8,398-405.

Pau, K. Y. F., Khorram, O., Kaynard, A, H Spies, H. G. (1989). Simultaneous induction of neuropeptide Y and gonadotropin-releasing hormone release in rabbit hypothalamus. *Neuroendocrinology* 49, 197-201.

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

Perez-Sanchez, J., Weil, C., Le Bail, P.Y, (1992). Effects of human insulin-like growth factor-I on release of growth hormone by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary cells. *J. Exp. Zool.* 262, 287-290.

Peter, E.R. Chang, J.P. (1999). Brain regulation, growth hormone secretion and food intake in fish. *Neural Regulation in the Vertebrate Endocrine System*, edit by Prasada Rao and Peter, Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York, 1999. pp. 55-67.

Peter, R.E. (1986). Vertebrate neurohormonal systems. In "Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications" (P.K.T. Pang and M.P. Schreiber, Eds), Vol 1, pp. 57-91. Academic Press, New York.

Peter, R.E. Gill, V.E., (1975) A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neur.* 159: 69-102.

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

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

Pikavance, L.C., Staines, W.A., Fryer, J.N., (1992) Distribution and colocalization of neuropeptide Y and somatostatin in the goldfish brain. *J. Chem. Neuroanat.* 5: 221-233.

Plisetskaya, E.M., Pollock, H.G., Rouse, J.B., Hamilton, J.W., Kimmel, J.R., Andrews, P.C., Gorbman, A., (1986) Characterization of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) islet somatostatins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 63: 252-263.

Pontet, A., Danger, J. M., Dubourg, P., Pelletier, G., Vaudry, H., Calas, A. Kah, O. (1989). Distribution and characterization of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain and pituitary of the goldfish. *Cell Tissue Res.* 255, 529-538.

Prasada Rao, P.D., Job, T., Schreiberman, M.P. (1993). Hypophysiotropic neurons in the hypothalamus of the catfish *Clarias batrachus*: A cobalt lysine and HRP study. *Brain Behav. Evol.* 42, 24-38.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Prasada Rao, P.D., Rajendra Babu, P., Jadahao, A.G. (1987). Distribution of serotonin-like immunoreactivity in the hypothalamus and pineal organ of the catfish, *Mystus vitatus* (Bl.). In "Proc. First Congr. Asia Oceana Soc. Comp. Endocrinol" (E. Ohnishi, Y Nagahama, and H. Ishizaki, Eds), pp 115-116. Nagoya Univ. Corp., Nagoya, Japan.

Puzdrowski, R. L. (1988). Afferent projections of the trigeminal nerve in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Morph.* 198, 131-147.

Rao, S.D., Prasada Rao, P.D., Peter, R.E. (1996). Growth hormone-releasing hormone immunoreactivity in brain, pituitary, and pineal of the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102, 210-220.

Rao, S.D., Prasada Rao, P.D., Peter, R.E. (1996). Growth hormone-releasing hormone immunoreactivity in the brain, pituitary, and pineal of the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102, 210-220.

Reisine, T., Bell, G.I. (1995). Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocrinol. Rev.* 16, 427-442.

Sarnat, H.B., Netsky, M.G. (1973). "Evolution of the Nervous System", p. 318. Oxford Univ. Press. New York.

Sas, E., Maler, (1991). The distribution of somatostatin in the brain of weakly electric fish: An immunohistochemical study. *J. Chem. Neuroanat.* 4, 155-186.

Schreck, B. C., Moyle, P. B. (1990). *Methods for fish Biology*, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. USA, pp 372.

Sokolowska, M., Peter, R. E., Nahorniak, C. S, Chang, S. P. (1985) Seasonal effects of pimozone and des Gly¹⁶ (Ala⁶) LH-RH gonadotropin secretion in goldfish. *Can. J. Zool.* 57:472-479

Sower, S.A., Chiang, Y.C., Conlon, J.M. (1994). Polygenetic expression of somatostatin in lamprey. *Peptides* 15, 151-154.

Spieß, J., Rivier, J. E., Rodkey, J.A., Bennett, C.D., Vale, W. (1979). Isolation and characterization of somatostatin from pigeon pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2974-2978. Switzerland. Pags 1-15.

Stacey, N. E., Cardwell, J. R., Liley, N. R., Scott, A. P., Sorenson, P. W., (1994). Hormones as sex pheromones. In : Davey KB, Peter, RE, Tobe SS, editors. *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa: National Research Council of Canada: 438-448.

Staines, W. A., Meister, B., Melander, T., Nagy, J. I. Hokflet, T. (1988). Three color immunofluorescence histochemistry allowing triple labeling within a single section. *J. Histochem. Cytochem.* 36, 145-151.

Sweeting, R.M., Mckeown, B.A. (1986). Somatostatin rduces plasma growth hormone levels during seawater adaptation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, *Can. J. Zool*, 64, 2062-2063.

Tannebaum, G.S., (1991). Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion, *Acta. Paediatr Scand.* (Suppl) 372: 5-16.

Taylor y Burns. (1974). Localization of immunoglobulins in paraffin sections for formaldehyde fixed tissues. In *Techniques in clinical immunology*. Ed. Thomson R.A. Blackwell scientific publication. Oxford. 1981.

Trudeau VL, GM Somoza, Cs Nahorniak, RE Peter, (1992). Interactions of estradiol whith gonadotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. *Neuroendocrinology* 56: 483-490.

Vigh- Teichmann I. Vigh B, Korf HW. Oksche A (1983). CSF- contacting and other somatostatin-immunoreactive neurons in the brains of *Anguilla anguilla*, *Phoxinus phoxinus*, and *Salmo gairdneri* (Teleostei). *Cell Tissue Res* 233: 319-334.

Vincent, S. R., Johansson, O., Hokfelt, T., Skirboll, L., Elde, R. P., Terenius, L., Kimmel, J. Goldstein, M. (1983). NADPH-diaphorase: selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin and avian-pancreatic polypeptide (APP)- like immunoreactivities. *J. Comp. Neurol.* 217, 252-263.

Vincent, S. R., McIntosh, C. H. S., Buchan, A. M. J. Brown, J. C. (1985). Central somatostatin systems revealed with monoclonal antibodies. *J. Comp. Neurol.* 238, 169-186.

Vincent, S. R., Skirboll, L., Hokfelt, T., Johanson, O., Lundberg, J. M., Elde, R. P., Terenius, L. Kimmel, J. (1982). Coexistence of somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)- like immunoreactivity in some forebrain neurons. *Neuroscience* 7, 439-446.

Wang, Y, Conlon, JM (1993). Neuroendocrine peptides (NPY, GRP, VIP, somatostatin) from the brain and stomach of the alligator. *Peptides* 14, 573-579.

Weir *et al*, (1974). Inactivation peroxidasa. In *Techniques in clinical immunology*. Ed. Thompson R.A. Blackwell scientific publication. Oxford. 1981.

Wong AOL, F Van Goor, RM Jobin, CM Neumann, JP Chang. (1994) Interactions of cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate protein kinase-C, and calcium in dopamine- and gonadotropin-releasing activity in goldfish. *Endocrinology* 135: 1593-1604.

Wong AOL, JP Chang, RE Peter, 1993. Characterization of D1 receptors mediating dopamine-stimulated growth hormone release from pituitary cells of the goldfish, *Carassius auratus*. *Endocrinology* 133: 577-584.

**Qué la imaginación sea tu combustible,
y la ciencia tu guía.**