



UNAM

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA.**

**“CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO DEL ESTRADIOL EN EL
NÚMERO DE CÉLULAS SOMATOTROPAS EN HIPÓFISIS DE
CARASSIUS AURATUS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA.

P R E S E N T A

GYOVANA NELLY ALFARO VÍQUEZ.

Director de tesis:
Dr. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS.



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.

DEDICATORIA

*A la memoria de mis abuelos **Gloria** y **Adolfo** y de mi tío **Chico** por todas y cada una de sus enseñanzas, por su amor, por sus sabios consejos y por ser la base de esta familia.*

*A mis padres **Olivia** y **Genaro**, gracias por darme la vida, porque han trabajado mucho por darme la oportunidad de ser alguien, por enseñarme que el desear algo es el primer paso y que después, sólo el esfuerzo constante nos ayuda a conseguir lo que en verdad anhelamos. Gracias por todo lo que me han brindado. Son un gran ejemplo a seguir y sin su amor, sus consejos, regaños, cuidados y su apoyo incondicional no lo hubiera logrado. Esto es para ustedes porque siempre son los primeros en creer en mí, les estoy infinitamente agradecida.*

*A mis hermanas **Gloria** y **Sandy**, por que a veces sin decir nada me demuestran el cariño y el amor que me tienen, por su apoyo y por todos los momentos de alegría que me han hecho pasar.*

*A mis tíos **Sofía** y **Pablo**, no tengo con que agradecerles todo lo que me han dado, porque sin su ayuda nada de esto sería posible, gracias por permitirme ser parte de su familia, pero sobre todo gracias por ser mis segundos padres.*

*A mi hermana **Candy**, a **Salvador** y a **Michelle**, por su cariño, por su compañía y por el apoyo que me han brindado en todo este tiempo.*

*A **Sócrates** por su amor, por toda su ayuda, por su apoyo incondicional, sus cuidados, sus consejos, por aceptarme tal como soy, por todos los momentos que hemos pasado juntos, pero sobre todo gracias por estar conmigo.*

*A mi tía **Margarita** por todos sus consejos, sus cuidados y por apoyarme siempre.*

*A **Pablo** y a **Zaira** por sus travesuras y por todos esos momentos alegres que he compartido a su lado .*

*A mis compadres **Beta** y **Efraín** por su amistad y por compartir conmigo momentos agradables.*

*A mi amigo **Alfredo** por brindarme su grandiosa y verdadera amistad y por hacerme más amenas las horas de trabajo en el laboratorio.*

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO:

Por la oportunidad que me dio de recibir una formación profesional, por brindarme unas experiencias inolvidables y porque fue un privilegio haber estudiado en la FES-IZTACALA.

Al Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas:

Muchas gracias por permitirme ingresar a su laboratorio, por compartir conmigo sus conocimientos y sus experiencias, por su apoyo, paciencia y asesoría de este trabajo. Además por brindarme su amistad, sus consejos y por darme una nueva visión de las cosas.

A la Biól. Mónica Chávez Maldonado:

Por haberme enseñado y ayudado en la parte experimental de este trabajo, por sus comentarios y su amistad a lo largo de este tiempo.

A la Dr. Juana Alba Luis Díaz:

Por su paciencia y tiempo dedicado en la revisión de este trabajo, así como por sus valiosas observaciones y consejos para enriquecerlo.

A la M. en C. Alba Felipa Márquez Espinoza:

Por sus correcciones y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Biól. Omar Ángeles López:

Por su amistad, por sus comentarios y consejos que me brindó en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Hipófisis.....	2
Hormona de Crecimiento.....	3
Secreción de la Hormona de Crecimiento.....	5
Factores que estimulan la liberación de la GH.....	6
El polipéptido Activador de la Adenilato ciclasa (PACAP).....	6
Hormona liberadora de la Hormona de Crecimiento (GHRH).....	7
Hormonas liberadoras de Gonadotropinas (GnRH).....	8
Dopamina (DA)	8
Factores que inhiben la liberación de GH.....	9
Somatostatina (SRIF).....	9
Serotonina (5HT).....	10
Norepinefrina (NE).....	10
Glutamato.....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
OBJETIVOS.....	15
General.....	15
Particulares.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
Preparación del tejido.....	17
Inmunohistoquímica.....	17
Conteo y análisis estadístico.....	17
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26

RESUMEN

En los peces, la regulación de la secreción de la hormona del crecimiento es un proceso multifactorial, entre los estimuladores de la secreción de esta hormona se encuentran: GnRHs, GHRH, PACAP y DA. La inhibición de esta la realiza fundamentalmente, la SS, 5HT y NE.

Este trabajo tuvo como finalidad establecer si existe una relación entre las concentraciones de estradiol y el número de células hipofisarias que producen GH, como un mecanismo para explicar el aumento en la concentración de esta hormona ante las elevadas cantidades del esteroide. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del estradiol sobre el número de células somatotropas en hembras inmaduras, maduras y en etapa de regresión sexual de *Carassius auratus*.

Se trabajo con dos grupos, el grupo testigo y el grupo experimental, cada uno con 15 hembras a las cuales se les extrajeron las hipófisis y fueron procesadas de acuerdo a la técnica inmunohistoquímica, usando un anticuerpo anti-GH II de conejo y anti-IgG de chivo anticonejo. Se realizó el análisis estadístico de los resultados, aplicándose la Distribución de T, con el fin de establecer diferencias entre el grupo testigo y el grupo experimental.

El mayor número de células inmunoreactivas se registró en las hembras inmaduras que fueron tratadas con estradiol, seguido de las hembras maduras. Las hembras en etapa de recrudescencia presentaron un menor aumento, en todos los grupos tratados con la hormona estrogénica, la diferencia fue significativa respecto a los grupos que no se les aplicó el tratamiento.

A manera de conclusión podemos decir que tanto en hembras inmaduras, recrudescientes y maduras del pez dorado, las altas concentraciones de estradiol circulante aumentan la cantidad de células GH inmunoreactivas en la hipófisis.

INTRODUCCIÓN

En los vertebrados la hipófisis se localiza en la base del diencefalo, por detrás del quiasma óptico y delante del saco vasculoso. De acuerdo a su origen embriológico, una parte deriva directamente del sistema nervioso, llamándosele neurohipófisis, la otra, está formada por la evaginación ectodérmica del techo de la cavidad bucal embrionaria y es conocida como adenohipófisis. Esta última, secreta diferentes tipos celulares y hormonas como son: las somatotropas produciendo hormona de crecimiento (GH) o somatotropina, las lactotropas secretando prolactina (PRL), corticotropas secretando hormona adrenocorticotropina (ACTH), péptidos de melanocortina y β -endorfina, todos derivados del péptido precursor de la proopiomelanocortinotrópico (POMC), tirotropas produciendo hormona estimulante de la tiroides (TSH), gonadotropas secretando la hormona gonadotropina (GtH), hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).

En peces, a la adenohipófisis se le reconocen tres partes: una rostral o *pars distalis rostralis* (PDR) que contiene fundamentalmente a las células lactotropas y corticotropas, otra más caudal o *pars distalis proximalis* (PDP) que incluye a las somatotropas, gonadotropas y tirotropas, una *pars intermedia* (PI) que contiene células productoras de hormona estimulante de los melanocitos y somatolactina (Fig. 1) (Seuntjesns et al., 2002; Eckert et al., 1990; Espinosa y Labarta, 1986; Peter et al., 1990, Norris, 1997).

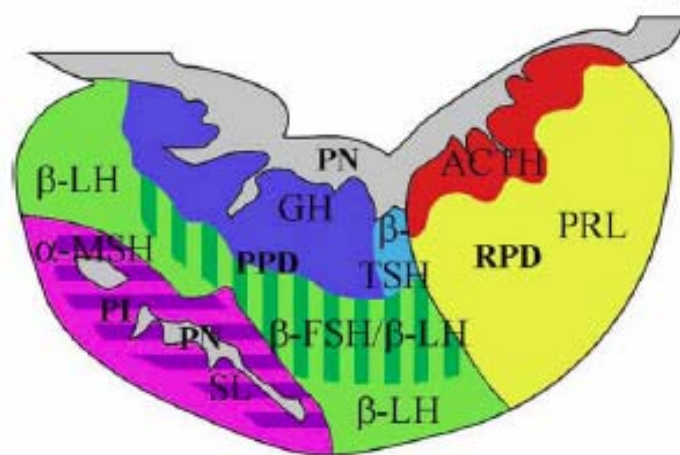


FIG. 1 Mapa de localización de las hormonas hipofisiarias. La *Pars Distalis Rostralis* (RPD), está coloreada en rojo (la región de ACTH) y en amarillo (la región de PRL). La *Pars Distalis Proximalis* (PPD) está coloreada de azul fuerte (la región de GH) y de azul claro (la región de β -TSH), en verde rayado se representa a (β -FSH y β -LH). La *Pars Intermedia* (PI) está coloreada de violeta representando a (α -MSH), las células de la SL coloreadas de violeta oscuro y la *Pars Nerviosa* (PN) está coloreada de gris. Modificado de Kasper et al., 2006.

En peces teleósteos, el eje hipotálamo-hipófisis difiere del resto de los vertebrados, ya que la entrega de neurohormonas producidas en el hipotálamo a la adenohipófisis es de manera directa a través de axones que llegan a la proximidad de las células endocrinas de esta última glándula. En este mismo grupo de vertebrados, las células somatotropas están localizadas en la *pars distalis proximalis* (PDP) y son las células más grandes y abundantes en la adenohipófisis. Su forma es esférica u ovoide, con retículo endoplásmico rugoso medianamente desarrollado, gránulos de secreción abundantes y relativamente grandes, de 350 a 400 nm de diámetro en promedio. Su núcleo celular es central (Villaplana *et al.*, 2003).

HORMONA DE CRECIMIENTO

La Hormona de Crecimiento (GH), junto con la prolactina (PRL), pertenece a una familia de hormonas peptídicas secretadas por la adenohipófisis de todos los vertebrados. En peces, dicha glándula además secreta a la somatolactina (Norris, 1997).

En el pez dorado, la hormona de crecimiento (GH), es una hormona multifuncional, producida en las células somatotropas de la hipófisis, su principal función es la de inducir el crecimiento corporal del organismo. Además de este papel, en teleósteos, la GH juega un papel importante como regulador en distintos eventos fisiológicos incluyendo la regulación osmótica, el crecimiento somático y el metabolismo, pero también desempeña un papel importante en el sistema reproductivo e inmune (Herrero *et al.* 2003). Más recientemente se ha asociado a la GH con fenómenos reproductivos al participar ayudando a estimular la esteroidogénesis, tanto en mamíferos (Childs, 2000; Hull y Harvey, 2000; 2002) como en los peces (Le Gac *et al.*, 1993).

Alrededor del 50% de la molécula de GH presenta una estructura α -helicoidal, con 4 dominios altamente conservados (Fig. 2), de acuerdo a determinaciones realizadas por medio de cristalografía de rayos X, muestran que la GH de cerdo tiene cuatro α hélices antiparalelas en diversos segmentos de su longitud (Abdel Meguid *et al.*, 1987).

Actualmente se reconoce que la hormona de crecimiento es en realidad una familia de proteínas, formada por isohormonas y/o variantes moleculares presentes en la mayor parte de los vertebrados. En el caso específico de la GH, el término isohormona describe a proteínas con diferencias en su secuencia de aminoácidos (lo que puede obtenerse a

partir de la transcripción de diferentes genes, por proceso de corte y empalme alternativos o por la expresión de diferentes alelos), mientras que el término variante se utiliza para describir cambios efectuados a nivel postraduccional (como glicosilación, fosforilación, acetilación, desamidación, etc). (Arámburo *et al.*, 1997).

HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)

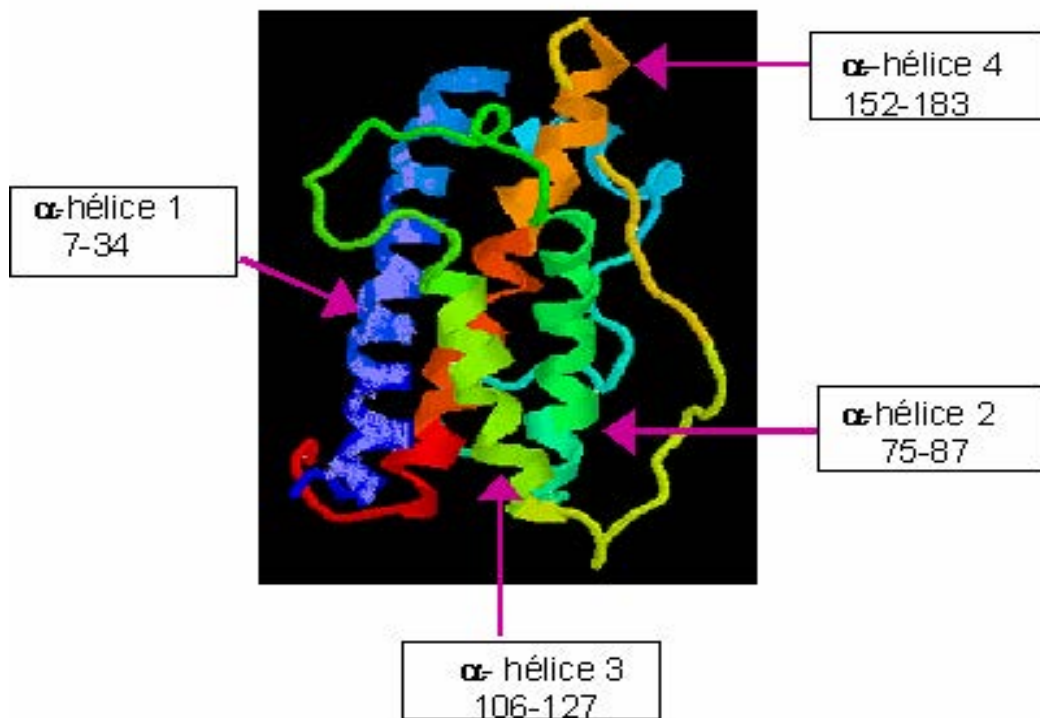


FIG. 2 Esquema de la hormona de crecimiento y sus 4 dominios transmembranales. Modificada de Cárdenas, 2005.

Específicamente en el pez dorado se ha reportado la presencia de dos isohormonas de GH, denominadas gfGH-I y gfGH-II, respectivamente. Esta clasificación se realizó con base en la secuencia nucleotídica obtenida a partir de cDNAs. Ambas isoformas tienen 188 aminoácidos en sus formas maduras y son biológicamente activas. También cuentan como prohormonas con un péptido señal de 22 aminoácidos. La gfGH-I presenta 5 residuos de cisteína (Cys-49, Cys-123, Cys-161, Cys-178 y Cys 186) lo que establece una similitud con otras isoformas de GH aisladas de otras especies de peces ciprínidos. La gfGH-II tiene 4 residuos de cisteína entre sus aminoácidos (no se encuentra la Cys-123), lo que le confiere una mayor similitud con las GHs del resto de los vertebrados (Fig. 3)

(Law *et al.*, 1996). Como se ha observado en otras especies de teleósteos, no es rara la presencia de más de una isoforma de GH, ejemplo de ello, son diversas especies de salmónidos como: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus keta* (Argellon *et al.*, 1988; Johansen *et al.*, 1989; Sekine *et al.*, 1989), y el bacalao del atlántico *Gadus morhua* (Rand-Weaver *et al.*, 1989).

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS DOS ISOFORMAS DE GH EN TELEÓSTEOS

I MARALVLLSVVLVSLLVNQGRA SDNQRLFNNAVIRVQHLHQLAA 22
 II MARALVLLSVVLVSLLVNQGRA SDNQRLFNNAVIRVQHLHQLAA 22

I KMINDFEDSLLPEERRQLSKIF PLSF**C**NSDYIEAPT**GK**DETQKS 65
 II KMINDFEDSLLPEERRQLSKIF PLSF**C**NSDYIEAPT**GK**DETQKS 65

I SMLKLLR**V**SFRLIESWE**F**PSQT LSGTVSNSLTVGNPNQITEKLA 110
 II SMLKLLR**I**SFRLIESWE**Y**PSQT LSGTVSNSLTAGNP**N**QITEKLA 110

I DLKMGIS**V**LI**QA**CLDGQPN**M**DD NDSLPLPFE**E**FYLTMG**D**NSLRE 154
 II DLKMGIN**V**LI**KGS**LDGQPN**I**DD NDSLPLPFE**D**FYLTMG**E**NNLRE 154

I SFRLLA**C**FKKDMHKVETYL**R**VA N**C**RRSLDSN**C**TL 188 aa Similar a ciprínidos
 II SFRLLA**C**FKKDMHKVETYL**R**VA N**C**RRSLDSN**C**TL 188 aa Similar al resto de teleósteos

Fig. 3 Secuencias de aa deducidas a partir de ADNc para GH-I (I) y GH-II (II) de pez dorado. Modificada de Cárdenas, 2005.

SECRECIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La secreción de GH, está regulada por factores neuroendocrinos hipotálamicos, los cuales actúan directamente en las células somatotropas. El grado de influencia neuroendocrina en la secreción de GH está determinado por el estado nutricional y reproductivo del pez (Björnsson, 1997).

La acciones de la GH en los tejidos pueden ser directas o mediadas por el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I). Se ha determinado la expresión de IGF-I en el cerebro, el hígado, el músculo, el corazón, el intestino, el páncreas, el riñón y las

gónadas. Sus principales acciones sobre el metabolismo son: aumento de la síntesis de DNA y favorece el transporte de los aminoácidos (Peter y Chang, 1999).

FACTORES QUE ESTIMULAN LA LIBERACIÓN DE LA GH

La liberación de la hormona de crecimiento (GH) en el pez dorado es estimulada por el péptido activador de la adenilato ciclasa en la hipófisis (PACAP), hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHs), hormona liberadora de tirotrópina (TRH), el neuropeptido Y (NPY), la dopamina (DA), y la colecistoquinina (CCK). A continuación se hará referencia a cada una de las moléculas.

EL PÉPTIDO ACTIVADOR DE LA ADENILATO CICLASA EN LA HIPÓFISIS (PACAP)

El péptido activador de la adenilato ciclasa en la hipófisis (PACAP) tiene dos isoformas, una de 38 aminoácidos (PACAP 38) y la otra de 27 aminoácidos (PACAP27). En peces teleósteos la forma predominante que se encuentra en el encéfalo es la de 38 aminoácidos. PACAP, es una sustancia capaz de inducir la liberación de la Hormona de Crecimiento, en el periodo de regresión sexual (Peng y Peter, 1997, Melamed *et al.*, 1993).

En el pez dorado hay dos isoformas de PACAP 38, estas son: PACAP 38a y PACAP 38b, las cuales han sido clonadas. Estas dos isoformas de PACAP son efectivas para estimular la liberación de GH en las células hipofisiarias de pez dorado. En contraste con mamíferos, en el cual PACAP es solo un estimulador débil de la liberación de GH y la magnitud de respuestas de GH inducidas por PACAPs de pez dorado es similar. Esto sugiere que PACAP puede servir como un potente secretor de GH en los ciprínidos. En el pez dorado, PACAP es estimulador de la secreción de GH y GTH-II ambos *in vivo* o *in vitro*. La acción liberadora de GH es mediada por PACAP a través de los receptores pituitarios acoplados a PAC1 por las vías de la Adenilato ciclasa-Adenosin monofosfato cíclico-Protein cinasa A y Fosfolipasa C -Protein cinasa C (AC-cAMP-PKA y PLC- IP3- C). (Wong *et al.*, 2000).

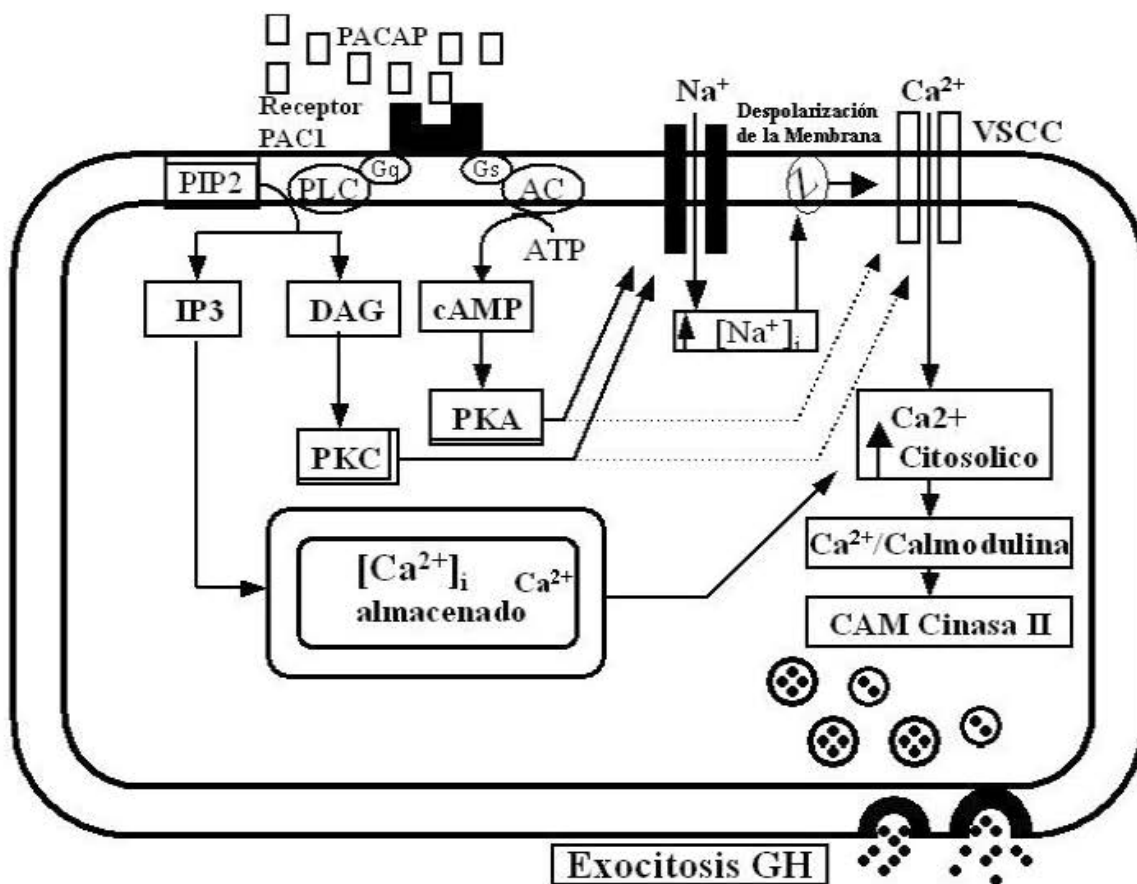


FIG. 4 Un modelo de los mecanismos de traducción de señales mediante la estimulación de PACAP, para la liberación de GH en las somatotropas de pez dorado.

HORMONA LIBERADORA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

En los peces la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), cuenta con dos isoformas: una de 45 aminoácidos (cGHRH⁴⁵) y otra con 29 aminoácidos (cGHRH²⁹), ambas poseen una actividad secretagoga sobre las somatotropas (Vaughan *et al.*, 1992).

En el pez dorado la efectividad de la GHRH para estimular la liberación de la GH parece depender de la etapa del ciclo sexual, pues en experimentos realizados con peces en las fases de recrudescencia tardía y madurez sexual no se registró capacidad inductora de la liberación de GH (Marchant *et al.*, 1989b); sin embargo, durante la regresión gonadal (etapa después de la reproducción, en la cual las gónadas no han reactivado de manera evidente la gametogénesis) la GHRH es el principal estimulador de la secreción de GH (Vaughan *et al.*, 1992; Peng y Peter, 1997).

HORMONAS LIBERADORAS DE GONADOTOPINAS

El cerebro y la hipófisis del pez dorado contienen por lo menos dos isoformas de GnRHs: sGnRH de salmón y cGnRH-II de pollo, son capaces de inducir la liberación de GH por parte de las células somatotropas de la hipófisis en especies como el pez dorado (Marchant *et al.*, 1989), la carpa (Lin *et al.*, 1993a) y en tilapia (Melamed *et al.*, 1995a), pero no en trucha (Blaise *et al.*, 1995).

sGnRH y cGnRH-II activan a segundos mensajeros similares. Ambos GnRHs activan a PKC, mediante la estimulación de GnRHs y del $[Ca^{2+}]_e$ entra a través de canales de calcio sensibles al voltaje (VSCC). El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ interactúa positivamente con PKC para incrementar la liberación de GH. CaM cinasa II también está involucrada en el paso distal de PKC, están involucrados en la estimulación prolongada de la secreción GH. Aunque el papel de los canales de sodio en las somatotropas no han sido caracterizados (Chang *et al.*, 1996).

GnRHs han mostrado estimular la secreción de GH *in vivo* e *in vitro* en carpa (*Cyprinus carpio*) (Lin *et al.*, 1995), en el pez dorado (*Carassius auratus*) (Marchant *et al.*, 1989a; Chang y De Leeuw, 1990; Wong *et al.*, 1993c) y en un híbrido de tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Melamed *et al.*, 1995a) (Holloway y Leatherland, 1998).

DOPAMINA

La Dopamina (DA), es un importante factor liberador de GH en el pez dorado, especialmente en peces en regresión gonadal (Lee *et al.*, 2000). Pero inhibe la liberación de GH en la hipófisis de trucha arcoiris. Las acciones de la DA, son mediados a través de los receptores acoplados a proteínas G, se divide en dos clases: D1 y D2. Estas dos clases son distinguidas por sus vías de señalización intracelular: los receptores D1 están ligados a la estimulación de la adenilato ciclasa, mientras que los receptores D2 inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (Nelson y Sheridan, 2005).

El mecanismo seguido por la DA para la estimulación de la secreción de GH involucra a la enzima adenilato ciclasa y la formación de AMPc como un segundo mensajero, debido a que en experimentos que se han utilizado sustancias que aumentan la concentración de AMPc como la forskolina o el IBMX, o que imitan sus efectos como el 8-bromo-AMPc o

dibutiril-AMPc, dan por resultado un aumento en la liberación de GH (Wong *et al.*, 1993b, 1994).

FACTORES QUE INHIBEN LA LIBERACIÓN DE GH

La liberación de la GH es inhibida por factores neuroendocrinos, incluyendo la somatostatina 14, serotonina, norepinefrina y el glutamato. A continuación se hará referencia a cada una de las moléculas.

SOMATOSTATINA

Las somatostatinas o SRIF, son una familia estructuralmente diversa de hormonas péptido que regulan una variedad de procesos biológicos en vertebrados, incluyendo varios aspectos de crecimiento, desarrollo y metabolismo (Nelson y Sheridan, 2005).

La somatostatina 14 es producida por el hipotálamo y ejerce su influencia sobre las células somatotropas a través de receptores de membrana (Kwong y Chang, 1997). SRIF es uno de los más potentes y efectivos inhibidores de la liberación y estimulación de GH.

La inhibición *in vivo* e *in vitro* de la liberación de GH por la somatostatina ha sido demostrada en un número de peces teleósteos, incluyendo el pez dorado (*Carassius auratus*) (Cook y Peter, 1984), pez gato (*Clarias gariepinus*) (Oyama *et al.*, 1981), sailfin molly (*Poecilia latipinna*) (Batten y Wigham, 1984), tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Rivas *et al.*, 1986), rodaballo (*Psetta maxima*) (Rosseau *et al.*, 2001), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Lou *et al.*, 1990) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Sweeting y McKeown, 1987) (Nelson y Sheridan, 2005).

Para mamíferos se han descrito 5 subtipos de receptores a somatostatina (sst1, sst2, sst3, sst4, sst5), todos los subtipos se han identificado como pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con siete dominios transmembranales. Los cinco subtipos están agrupados en dos subfamilias con base en el grado de similitud entre ellos; una subfamilia incluye a los subtipos 1 y 4 mientras que la otra contiene a los subtipos 2, 3 y 5 (Bruns *et al.*, 1995 y Viollet, 1995).

El pez dorado (*Carassius auratus*), posee dos diversas preprosomatostatinas (PPSS), la PPSS I aislada del cerebro que contiene [Glu1, Tyr7, Gly10] - SS-14 y la PPSS II aislada del intestino que contiene [Tyr7, Gly10] - SS-14 (Lin *et al.*, 2000).

En el pez dorado, otras variantes de somatostatina como la SS-22 o SS-25 tienen una menor capacidad de inhibición en la liberación de GH (Marchant *et al.*, 1987, Marchant y Peter, 1989).

SEROTONINA

Estudios *in vivo* o *in vitro* han demostrado que la serotonina o 5HT actúa a nivel de las células pituitarias para inhibir la secreción de GH basal. La serotonina puede actuar directamente en las somatotropas vía los receptores 5HT₂, aunque está es una evidencia para sugerir que también actúa con otros factores hipotálamicos (Holloway y Leatherland, 1998).

NOREPINEFRINA

Previos experimentos *in vitro* y recientes estudios *in vivo* indican que la norepinefrina disminuye los niveles de GH circulante en el pez dorado, por acciones en las células pituitarias para disminuir la secreción basal de GH. El efecto inhibitorio de la norepinefrina se ha demostrado por ser mediado a través de adrenoreceptores α -2. Sin embargo, no se sabe cuáles son los mecanismos intracelulares a través de los cuales la norepinefrina inhibe la liberación de GH (Yunker *et al.*, 2000).

GLUTAMATO

El glutamato y el ácido γ -aminobutírico GABA son considerados como los mejores neurotransmisores excitadores e inhibidores en el cerebro de vertebrados. El glutamato se encuentra en los nervios terminales en la *Pars distalis* del pez dorado donde se localizan las somatotropas y gonadotropas. El glutamato con la activación del receptor *N*-metil-D-L-ácido aspártico (NMDA) estimula la liberación de GTH-II pero inhibe la liberación de GH, indicando una regulación diferencial de la liberación de la hormona de somatotropas y gonadotropas (Trudeau, 1996).

La Protein cinasa C (PKC) mediante la acción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) mientras que el Adenosin Monofosfato cíclico (cAMP) participa con la Dopamina mediante el receptor D1 (DA/D1) y el péptido activador de la adenilato ciclasa en la hipófisis a través del receptor PAC1 (PACAP/PAC1) estimulan la secreción de GH. La activación de la Protein cinasa C (PKC) y el Adenosin Monofosfato cíclico (cAMP) inducen un incremento en la entrada de Ca^{2+} . La activación de PKC y cAMP también conducen un incremento en la entrada de Ca^{2+} a través de canales de calcio sensibles al voltaje (VSSC) y calmodulina CaM dependiente para la liberación de la hormona, PKC activa un sistema de Na^+/H^+ . Sugieren que una cascada de Oxido nitroso/ Guanosin monofosfato cíclico (NO/cGMP) también participa en la estimulación de la liberación de GH a través de GnRH, D1 y PACAP. SRIF y NE (vía los receptores $\alpha-2$) inhiben las respuestas de GH por acciones sobre PKC-, cAMP- y Ca^{2+} dependientes de la liberación de GH (Wong *et al.*, 2000) (Fig.5).

En la Tabla I se muestra una relación actualizada de los factores que influyen la liberación o inhibición de la GH en peces teleósteos.

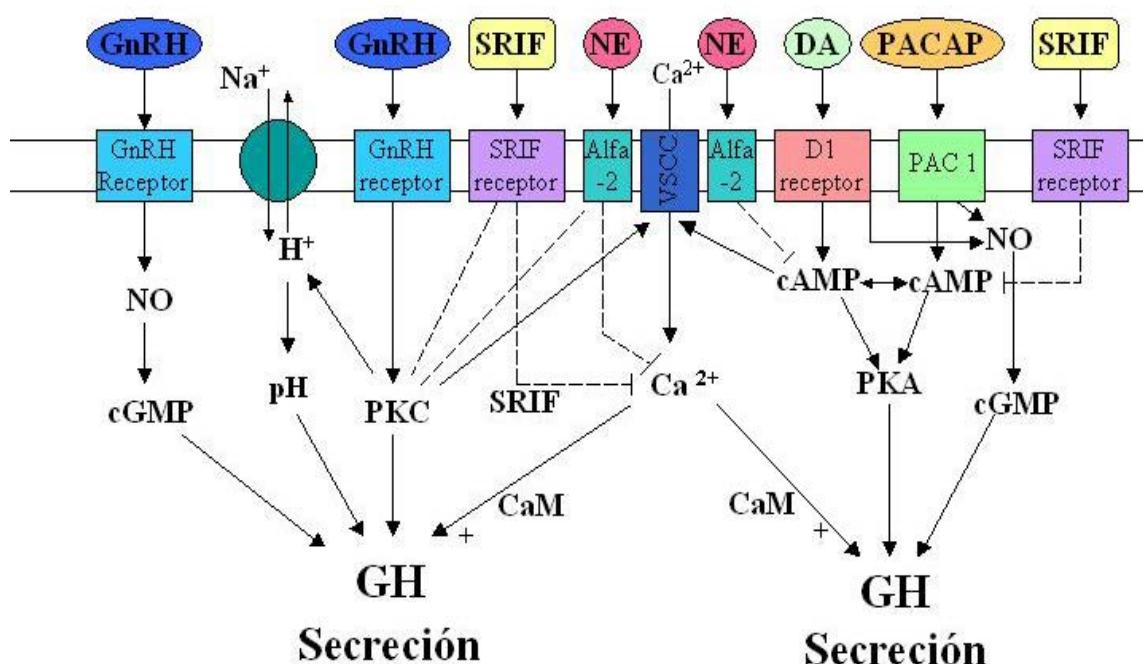


Fig. 5 Diagrama que resume las vías de traducción de señales mediante la regulación neuroendocrina multifactorial de la secreción de GH por GnRH, DA, PACAP, SRIF y NE en las somatotropas de pez dorado. (Modificado de Wong *et al.*, 2000).

Tabla I Regulación multifactorial de Hormona de Crecimiento en modelos de peces. Modificada de Wong, *et al.* 2005.

Señales del cerebro		Referencias
Neuropéptidos		
GnRH	Estimula la liberación de GH y la expresión del mRNA de GH (ejemplo: pez dorado, tilapia y carpa común)	Klausen <i>et al.</i> , 2001; Melamed <i>et al.</i> , 1996; Li <i>et al.</i> , 2002.
	Acción directa a nivel hipófisis (ejemplo: pez dorado, carpa común y tilapia)	Klausen <i>et al.</i> , 2001; Melamed <i>et al.</i> , 1996; Li <i>et al.</i> , 2002.
	La respuesta de la GH puede requerir un tratamiento de IGF-I (ejemplo: trucha arcoiris)	Weil <i>et al.</i> , 1999.
GHRH	Tiene un efecto suave o débil en la liberación de la GH a nivel hipófisis (ejemplo: pez dorado, trucha arcoiris)	Vaughan <i>et al.</i> , 1992; Luo and McKeown, 1991b. Melamed <i>et al.</i> , 1995b.
	Ningún efecto en liberación de la GH en una cierta especie (ejemplo: anguila, carpa herbívora, turballo)	Montero <i>et al.</i> , 1998; Wong <i>et al.</i> , 1998b; Rousseau <i>et al.</i> , 2001.
	Ningún reporte sobre la expresión del gen de GH en pez	
PACAP	Estimula la liberación y la expresión del mRNA de GH (ejemplo: pez dorado y anguila)	Wong <i>et al.</i> , 1998a; Montero <i>et al.</i> , 1998.
	Acción directa a nivel hipófisis vía los receptores PAC-1 (ejemplo: pez dorado y carpa común)	Wong <i>et al.</i> , 1998a; Xiao <i>et al.</i> , 2002.
	Codificado con GHRH en el mismo gen y se propone para ser GHRH ancestral	Montero <i>et al.</i> , 2000.
SRIF	Inhibe la liberación de la GH a nivel hipófisis vía los receptores SST-2 (ejemplo: pez dorado)	Wong <i>et al.</i> , 1993b; Lin <i>et al.</i> , 2000.
	No afecta la expresión del mRNA de GH (ejemplo: tilapia, trucha arcoiris)	Melamed <i>et al.</i> , 1996; Yada y Hirano, 1992.
	Puede inhibir la producción de GH a nivel de traducción (ejemplo: trucha arcoiris)	Yada y Hirano, 1992.
	No induce una post-inhibición después de la unión a GH en mamíferos (ejemplo: pez dorado, carpa herbívora)	Wong <i>et al.</i> , 1998b; Wong <i>et al.</i> , 1993b.
NPY	Estimula la liberación de GH directamente a nivel hipófisis (ejemplo: pez dorado)	Peng <i>et al.</i> , 1990; Peng <i>et al.</i> , 1993.
	Induce la liberación de GH indirectamente por GnRH y la vía presináptica de receptores Y2 (ejemplo: pez dorado)	Peng <i>et al.</i> , 1993.
TRH	Estimula la liberación directamente de GH a nivel hipófisis (ejemplo: pez dorado y carpa común)	Tradeau <i>et al.</i> , 1992; Lin <i>et al.</i> , 1993a.
	Incrementa la GH en plasma pero afecta en la liberación de GH a nivel hipófisis (ejemplo: tilapia)	Melamed <i>et al.</i> , 1995a
CCK	Estimula la liberación de GH a nivel hipófisis (ejemplo: pez dorado)	Himick <i>et al.</i> , 1993.
Bombesina	Estimula la liberación de GH a nivel hipófisis (ejemplo: pez dorado)	Himick y Peter, 1995.
Neurotransmisores		
Dopamina	Estimula la liberación de GH y /o la expresión del mRNA de GH (ejemplo: tilapia, pez dorado)	Melamed <i>et al.</i> , 1996; Wong <i>et al.</i> , 1993a.
	Acción directa a nivel hipófisis vía los receptores D1 (ejemplo: pez dorado, carpa herbívora)	Wong <i>et al.</i> , 1998b; Wong <i>et al.</i> , 1993a.
	Acción indirecta en el cerebro para suprimir la expresión del gen de SRIF (ejemplo: pez dorado)	Otto <i>et al.</i> , 1999.
Norepinefrina	Inhibe la liberación de GH a nivel hipófisis vía los receptores α_2 (ejemplo: pez dorado)	Lee <i>et al.</i> , 2000; Yunker <i>et al.</i> , 2000.
	Induce la post-inhibición después de unión	Otto <i>et al.</i> , 1999.
Serotonina	Inhibe la secreción de GH a nivel hipófisis vía los receptores 5HT (ejemplo: pez dorado)	Somoza y Peter, 1991; Wong <i>et al.</i> , 1998c.

GABA	Reduce la GH en suero, probablemente por acciones directas de GnRH (ejemplo: pez dorado)	Trudeau <i>et al.</i> , 2000a; Trudeau <i>et al.</i> , 2000b.
	No afecta la liberación de GH a nivel hipófisis (ejemplo: pez dorado)	Trudeau <i>et al.</i> , 2000a.
Glutamato	Reduce la GH en suero, probablemente por una conversión subsecuente a GABA (ejemplo: pez dorado)	Trudeau <i>et al.</i> , 2000b; Trudeau <i>et al.</i> , 1996.
	Induce la liberación de GH a nivel hipófisis vía receptores NMDA (ejemplo: trucha arcoiris)	Holloway y Leatherland, 1997.

Señales dentro de la hipófisis		Referencias
Activina	Expresada en somatotropas para inducir / mantener la liberación de GH (ejemplo: pez dorado)	Ge y Peter, 1994.
IGF-I	Expresada en gonadotropas para prevenir la apoptosis en somatotropas (ejemplo: tilapia)	Melamed <i>et al.</i> , 1999.
Señales de órganos / tejidos periféricos		
IGF-s	GH estimula la expresión de IGF-I e IGF-II en el hígado del pez adulto (ejemplo: carpa, lubina roja)	Vong <i>et al.</i> , 2003a,b; Carnevali <i>et al.</i> , 2005.
	Inhibe la liberación de GH, el contenido de GH y la expresión del mRNA de GH (ejemplo: tilapia, trucha arcoiris)	Perez-Sánchez <i>et al.</i> , 1992; Kajimura <i>et al.</i> , 2002; Fruchtman <i>et al.</i> , 2000.
	Acción directa a nivel hipófisis vía los receptores D1 (ejemplo: róbalo rayado)	Fruchtman <i>et al.</i> , 2002.
Esteroides sexuales	Los efectos tienden a variar según las especies de peces	
	Acciones centrales para efectuar reguladores hipotálamicos de GH (ejemplo: GnRH y SRIF)	Breton y Sambroni, 1996; Canosa <i>et al.</i> , 2002.
	Acción pituitaria para inducir la liberación de GH (ejemplo: E ₂ en tilapia)	Melamed <i>et al.</i> , 1995b.
	Acción pituitaria para incrementar la expresión del mRNA de GH (ejemplo: T en pez dorado)	Huggard <i>et al.</i> , 1996.
	Puede incrementar la producción de GH a nivel de traducción (ejemplo: E ₂ en pez dorado)	Zou <i>et al.</i> , 1997.
	Modifica la expresión de varias isoformas de los receptores de SRIF (ejemplo: E ₂ en pez dorado)	Cárdenas <i>et al.</i> , 2003; Canosa <i>et al.</i> , 2003.
T3/T4	Incrementa la secreción directa de GH a nivel hipófisis (ejemplo: trucha arcoiris)	Luo y McKeown, 1991a.
	Induce la expresión del mRNA de GH en células hipofisiarias (ejemplo: tilapia)	Moav y McKeown, 1992; Farchi-Pisanty <i>et al.</i> , 1995.
	Estimula la síntesis de novo de GH en hipófisis aisladas (ejemplo: tilapia)	Melamed <i>et al.</i> , 1995a.
Glucocorticoides	Incrementa la liberación de GH a nivel hipófisis (trucha arcoiris)	Luo y McKeown, 1991a.
	Incrementa los niveles de mRNA de GH en células hipofisiarias (ejemplo: tilapia, bagre de canal)	Uchida <i>et al.</i> , 2004; Peterson y Small, 2005.
Ghrelin	Incrementa la liberación de GH y/o el nivel de mRNA de GH a nivel hipófisis (ejemplo, tilapia y pez dorado)	Kaiya <i>et al.</i> , 2003a,b,c; Unniappan y Peter, 2004.
	GH-liberando las acciones mímicas por GHRPs y el no-péptido GHS (ejemplo: bagre, lubina roja)	Drennon <i>et al.</i> , 2003; Chan <i>et al.</i> , 2004a,b.
CNP/VNP	Incrementa la liberación de GH a nivel hipófisis (ejemplo: tilapia)	Eckert <i>et al.</i> , 2003.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace aproximadamente dos décadas, se conoce que los esteroides sexuales influyen la liberación de la GH en los mamíferos de manera directa (Carlsson *et al.*, 1987; Ho *et al.*, 1987) o mediada a través de la GHRH (Evans *et al.*, 1985; Shulman *et al.*, 1987). En general, está bien documentado que la testosterona aumenta la concentración de GH circulante, mientras que el estradiol los disminuye. (Huggar *et al.*, 1996; Trudeau *et al.*, 1992).

Trudeau *et al.*, en 1992 demostraron que en el pez dorado los implantes de estradiol en hembras con gónadas intactas, incrementan la liberación y la concentración de GH en suero. Esos hallazgos se han extendido a otros peces como la tilapia (Melamed *et al.*, 1995; Melamed *et al.*, 1998) y los salmónidos (Farchi-Pisanty *et al.*, 1995).

Dada la interrelación entre el estradiol y la GH, y que en experimentos realizados en *Carassius auratus* no se ha detectado un incremento en los niveles de expresión del mRNA de GH cuando se presentan altas concentraciones de estradiol circulante (Zuo *et al.*, 1997), en el presente trabajo se trató de buscar si existe una relación entre las altas concentraciones de estradiol y un incremento en el número de células hipofisarias que producen GH, como un mecanismo para explicar el aumento de hormona de crecimiento ante las elevadas cantidades del esteroide.

OBJETIVOS

GENERAL

- Determinar el efecto del estradiol sobre el número de células somatotropas en hembras inmaduras, maduras y en etapa de regresión sexual del pez dorado (*Carassius auratus*).

PARTICULARES

- Establecer si existen variaciones en el número de células hipofisarias inmunoreactivas a GH, tratadas con estradiol en hembras inmaduras del pez dorado.
- Determinar si existe una variación en el número de células hipofisarias inmunoreactivas a GH en hembras del pez dorado, implantadas con estradiol en etapa de regresión sexual.
- Determinar si en las hembras maduras del pez dorado, existe una variación en el número de células hipofisarias inmunoreactivas a GH, cuando se le administra estradiol.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 hembras inmaduras de pez dorado (*Carassius auratus*) con un peso en un rango de 12 a 25 g, que se mantuvieron bajo condiciones controladas; la temperatura fue de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y con aireación constante, el fotoperiodo fue de 13:11h. luz-oscuridad. A los animales se les proporcionó como alimento Golden Plus en partículas flotantes de 2.5 mm, ad libitum.

Las hembras fueron separadas en 2 grupos: un grupo experimental y un grupo testigo cada uno con 15 hembras. Las hembras del grupo experimental se les colocaron implantes de estradiol intraperitonealmente (100 mg/g de peso corporal), con una tasa de liberación de 0.249 ng/día, siguiendo el protocolo descrito por (Trudeau *et al.*,1991). Brevemente, para poner el implante fue necesario retirar una o dos escamas de la región abdominal del organismo, con una pinza fina, enseguida se practicó una pequeña incisión en la piel descamada y se introdujo un fragmento del polímero, de un tamaño proporcional al peso del individuo. El grupo testigo fue implantado intraperitonealmente con polímero que no contenía esteroide, esto se realizó siguiendo el mismo protocolo. Previa a la implantación, los peces fueron anestesiados por inmersión en agua con tricáinato metano sulfonato (MS-222) 5 ppm hasta que el movimiento opercular cesó.

A los cinco días después de la implantación, los peces fueron anestesiados nuevamente y se sacrificaron por medio de un corte de la médula espinal. Inmediatamente se extrajo la hipófisis para la detección de las células somatotropas a través de un técnica inmunohistoquímica (Taylor y Burns, 1974; Elson, 1995).

Los criterios para determinar la etapa sexual en que se encontraban las hembras fue el índice gonadosomático (IGS); se consideraron hembras inmaduras las que tuvieron un índice del 2% o menor. En estos animales el ovario tenía una apariencia gelatinosa, color translucido, sin vitelogenesis. Se consideraron hembras maduras las que tuvieron un índice gonádico del 7.5% o mayor, en éstas se apreciaba a simple vista una gran cantidad de ovocitos amarillos y las ramificaciones de la arteria ovárica. Con porcentajes intermedios del 2.1% al 7.4% los peces se consideran recrudescientes cuando en el ovario de estas hembras se observaron pocos ovocitos con un tamaño menor respecto a los de las hembras maduras. (Cárdenas, 2005).

De acuerdo con los trabajos realizados por Trudeau, 1991; Lin, 1995; Cárdenas, 2003 y Canosa, 2004, para la determinación de las etapas del ciclo sexual no se contempló realizar Radioinmunoanálisis o RIA.

Preparación del Tejido: Las hipófisis se fijaron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con paraformaldehído 2% y ácido pícrico (Stefanini *et al.*, 1967). Después se lavaron con PBS 1:3, se deshidrataron en alcoholes graduales ascendentes, se infiltraron en parafina y se incluyeron en paraplast. La hipófisis fue cortada de forma seriada con un micrótopo de rotación (Marca American Optical) a 5 μ m. Cada corte fue desparafinado en xilol, posteriormente, se hidrato sumergiéndolo en alcoholes descendentes, para finalmente realizar la técnica inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica: Los cortes se permeabilizaron en metanol a 20° C para inactivar la peróxidasa endógena se utilizó etanol ácido (Weir *et al.*, 1974). Las preparaciones se incubaron con suero bovino al 1% en PBS 1X a temperatura ambiente por 30 minutos. Los tejidos se expusieron al anticuerpo anti-GH de conejo durante 24 h a 4° C. Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de chivo anticonejo conjugado con peroxidasa por 2 horas a temperatura ambiente. El exceso del anticuerpo se lavó 2 veces con el amortiguador. El revelado se realizó con una solución de diaminobencidina y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30 %. Enseguida las preparaciones recibieron una contratinción con Hematoxilina de Mayer, se lavaron, deshidrataron con alcoholes graduales, se aclararon en xilol y por último se montaron con entellan®.

La especificidad del ensayo se confirmó con la elaboración de controles: (1) sin bloquear y con un 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 somatotropas cada 5 cortes con el propósito de que las células contadas no fueran las mismas, con un procesador de imágenes QWIN (Leica). Para que el número total de células por hipófisis fuera fidedigno se realizó el conteo con el objetivo de 10x y de 40x. Se realizó el análisis estadístico de los resultados, aplicándose la Distribución de T, con el fin de establecer diferencias entre el grupo testigo y el grupo experimental.

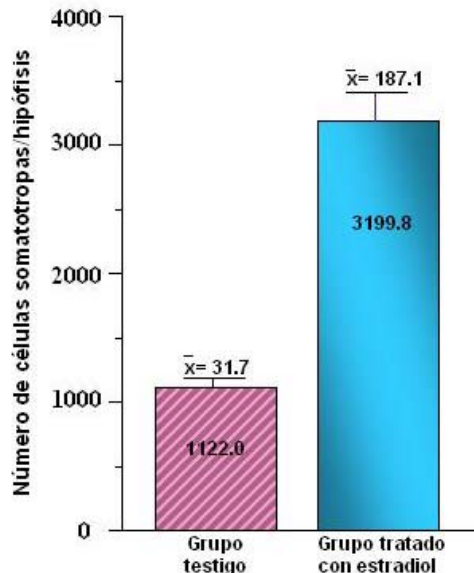
RESULTADOS

No se registraron diferencias significativas en el conteo de células somatotropas con los objetivos de 10X y de 40X. Se observa un incremento en los grupos experimentales con respecto a los grupos testigo.

Efectos del estradiol en el número de células somatotropas en hembras inmaduras

Los resultados obtenidos mostraron que en las hembras inmaduras los implantes de estradiol en los peces generaron un incremento de las células inmunoreactivas a GH o de células somatotropas en la hipófisis como puede observarse en la Fig. 6. Las glándulas de los individuos tratados presentaron una media de 3199.8 ± 187.1 de células somatotropas o inmunoreactivas a GH (Tabla II), lo que constituye una diferencia significativa ($p < 0.025$) respecto de los valores medios obtenidos del grupo control que fue de 1122.0 ± 31.7 (Fig.6). En la Gráfica 1 se muestra una representación de dichos resultados.

Número de células inmunoreactivas a GH en hipófisis de hembras inmaduras del pez dorado (*Carassius auratus*) (10x).

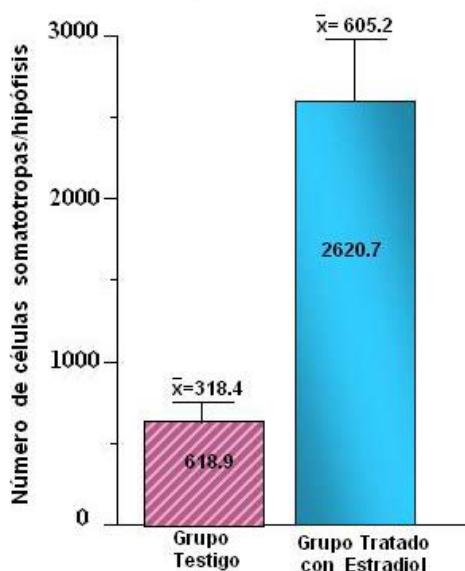


Gráfica 1. El promedio del número de células inmunoreactivas en el grupo testigo fue de 1122.0 y en el grupo tratado con estradiol de 3199.8. El primer grupo presentó una desviación de 31.7, mientras que el segundo de 187.1. El grupo tratado con estradiol presenta una diferencia significativa ($p < 0.025$) en comparación con el grupo testigo.

Efectos del estradiol en el número de células somatotropas en hembras recrudescientes

Las hembras recrudescientes también fueron sensibles a los implantes de estradiol, el grupo tratado tuvo una media de 2620.7 ± 605.2 de células somatotopas o inmunoreactivas a GH, que al contrastarse con la media obtenida de las hipófisis del grupo testigo que fue de 618.9 ± 318.4 (Tabla II), lo que permitió determinar una diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0.025$). En la gráfica 2 se muestra una representación de dichos resultados.

Número de células inmunoreactivas a GH en hipófisis de hembras recrudescientes del pez dorado (*Carassius auratus*) (10x).

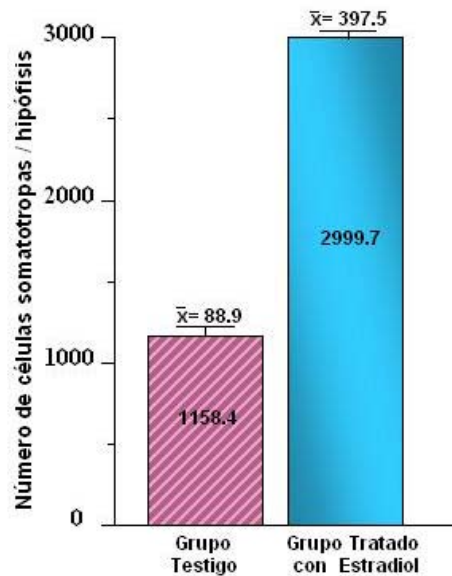


Gráfica 2. El promedio del número de células inmunoreactivas en el grupo testigo fue de 618.9 y en el grupo tratado con estradiol de 2620.7. El primer grupo presentó una desviación de 318.4, mientras que en el segundo fue de 605.2. El grupo tratado con estradiol presenta una diferencia significativa ($p < 0.025$) en comparación con el grupo testigo.

Efectos del estradiol en el número de células somatotropas en hembras maduras

En el caso de los peces sexualmente maduros, nuevamente se presentó una diferencia significativa de células somatotopas o inmunoreactivas a GH ($p < 0.025$), entre las hembras tratadas con estradiol y no tratadas (Fig.6) habiéndose registrado valores de 2999.7 ± 397.5 y 1158.4 ± 88.9 células, respectivamente. Se muestra una representación de dichos resultados en la gráfica 3.

Número de células inmunoreactivas a GH en hipófisis de hembras maduras del pez dorado (*Carassius auratus*) (10x).



Gráfica 3. El promedio del número de células inmunoreactivas en el grupo testigo fue de 1158.4 y en el grupo tratado con estradiol de 2999.7. El primer grupo presentó una desviación de 88.9, mientras que el segundo de 397.5. El grupo tratado con estradiol presenta una diferencia significativa ($p < 0.025$) en comparación con el grupo testigo.

	GRUPO TESTIGO 10X		GRUPO EXPERIMENTAL 10X		GRUPO TESTIGO 40X		GRUPO EXPERIMENTAL 40X	
	Promedio	D. E.	Promedio	D. E.	Promedio	D. E.	Promedio	D. E.
Hembras Inmaduras	1122.0	31.7	3199.8	187.1	1125.2	30.9	3199.3	189.9
Hembras Recrudescentes	618.9	318.4	2620.7	605.2	621.5	128.6	2599.1	581.8
Hembras Maduras	1158.4	88.9	2999.7	397.5	1160.9	89.8	3002.3	397.3

TABLA II. Promedio y Desviación Estándar (D. E.) del número de células somatotropas en hipófisis del pez dorado (*Carassius auratus*) cuantificadas con el objetivo de 10x y 40x .

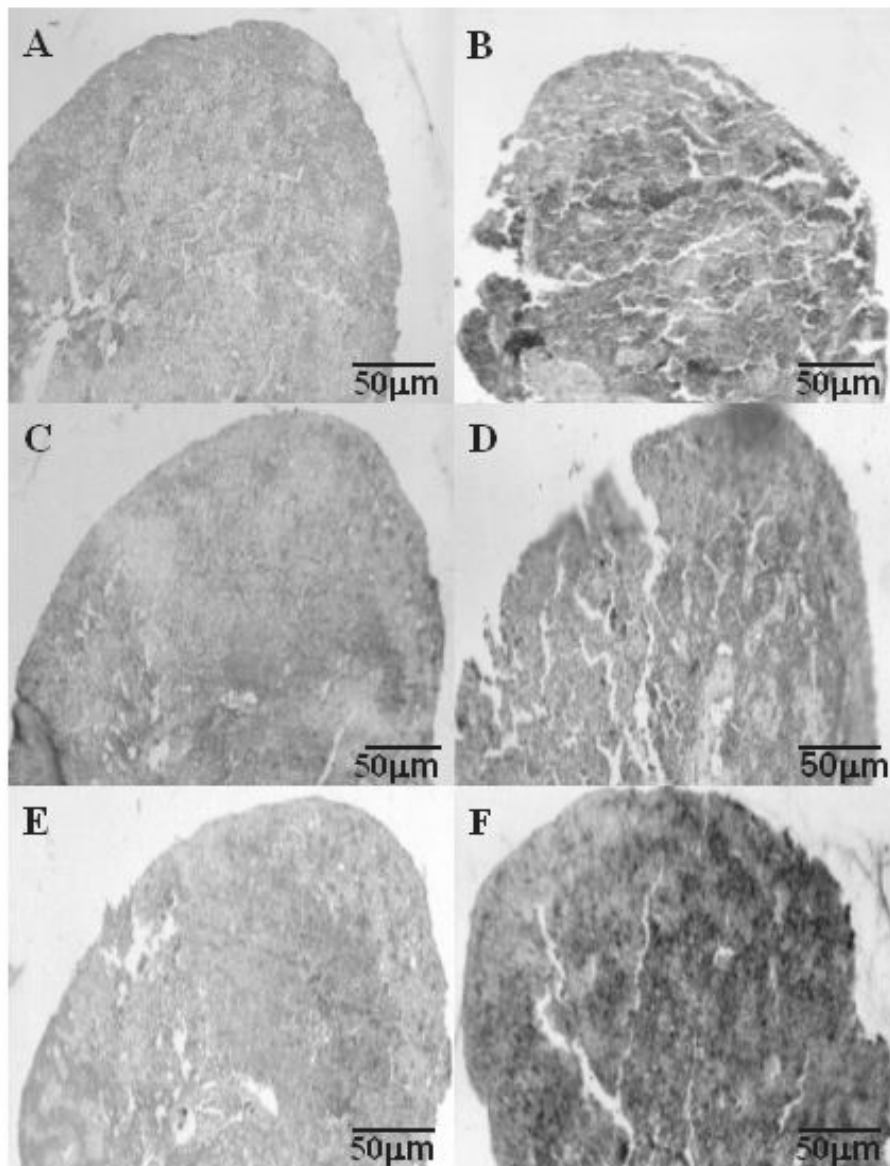


Fig. 6. Cortes Transversales de Hipófisis de pez dorado (*Carasius auratus*). **Hembras Testigo:** (A)Inmadura (C)Recrudescente (E)Madura. **Hembras Tratadas con Estradiol:** (B)Inmadura (D)Recrudescente (F)Madura. Contratación con Hematoxilina de Mayer, células inmunoreactivas a GH.

DISCUSIÓN

En los peces teleósteos, se ha descrito una relación entre el incremento de estradiol en suero y la concentración de la hormona del crecimiento (Trudeau *et al.*, 1992; Blaise *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 1997; Melamed *et al.*, 1996; 1998; Canosa *et al.*, 2002), estableciéndose que el aumento en la concentración de la segunda hormona es consecuencia de la presencia del estradiol. El mecanismo de dicho esteroide para inducir el incremento de la hormona de crecimiento en sangre está sujeto a un gran número de investigaciones (Trudeau *et al.*, 1992; Zou *et al.*, 1997; Cárdenas *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2005) y hasta la fecha, no existe una hipótesis clara que logre explicar completamente el fenómeno, por lo cual, es posible que el evento sea multifactorial.

Los resultados de este estudio señalan que el incremento significativo en el número de células inmunoreactivas a GH que se observó en todos los grupos de hembras tratadas (inmaduras, maduras y recrudescientes), respecto a sus grupos testigo, sugieren que el aumento de las concentraciones de GH en sangre es debido a un incremento en el número de células somatotropas cuando se tienen altas concentraciones de estradiol en el sistema.

Otras hipótesis postuladas han sido las de Zou *et al.*, en 1997 quienes argumentaron que el estradiol podía aumentar la concentración de GH en sangre, debido a un incremento de la transcripción de esta última a consecuencia del esteroide a través de un elemento de respuesta al estradiol (ERE) presente en el gen de GH. En dicho trabajo se detectó por Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-GH una mayor cantidad del péptido, pero no se registró un incremento de sus mRNAs, ello por medio de Southern blot.

En trabajos posteriores han investigado variaciones en la cantidad de mRNAs de somatostatinas en los núcleos hipotalámicos que inervan la RPD cuando se presentan modificaciones en la concentración de estradiol, tanto de manera natural, como bajo condiciones de implantes (Canosa *et al.*, 2004; 2005). También se ha reportado que altas concentraciones de estradiol disminuyen los mRNAs del subtipo 2 de receptor a somatostatina (sst2) en las hipófisis de hembras de *Carassius auratus*, lo que pudiera ser una prueba indirecta de que las moléculas estimuladoras pudieran ser más efectivas (Cárdenas *et al.*, 2003).

El incremento encontrado en el número de somatotropas observado entre los grupos tratados, es que, en los organismos inmaduros prácticamente no se detecta estradiol en circulación, y al aplicarles la hormona, las hipófisis responden de una forma exacerbada, mientras que en las hembras maduras, al ya haber estado sometidas a la influencia del estradiol, la respuesta es menos notoria. En el caso de las hembras recrudescientes, el resultado es más bajo y con una desviación mayor, lo cual pudiera deberse, al menos en parte, a la amplia variación en las condiciones de la gónada, pues al incluir individuos con índice gonadosomático (IGS) de alrededor del 3% a organismos casi maduros con un IGS de cerca del 8%, la respuesta tiende a ser heterogénea. Sin embargo, no existe ninguna duda de que el número de células que logró determinarse por la técnica utilizada es muy superior a lo registrado en los grupos testigo respectivos.

Entre otras hipótesis que nos ayudan a explicar el incremento de somatotropas se encuentra la de la cooperación celular en la hipófisis. Varios trabajos al respecto han aportado pruebas de que en la adenohipófisis de los mamíferos (Childs *et al.*, 2000; 2001; 2002 a; b; 2005 a; b) y más recientemente en los peces óseos (Wong *et al.*, 2005) las células endocrinas no sólo sintetizan un tipo hormonal (modelo de una célula-una hormona), sino que, al menos bajo ciertas circunstancias, algunas células endocrinas son capaces de sintetizar más de una hormona.

Las primeras relaciones que se establecieron fue entre las células gonadotropas y las células somatotropas, a las cuales se les detectó que además de poseer la proteína de la hormona de crecimiento, era posible localizar mRNA de alguna de las gonadotropinas, por lo que se les describió como células co-gonadotropas. Dicha relación era temporal y dependía de la fase del ciclo estral en que se encontrara la rata (Childs, 2002a).

En nuestro trabajo para explicar el aumento en las células inmunoreactivas a GH, existen al menos dos posibles explicaciones, una de ellas es que aumente la cantidad de somatotropas, a través de diferenciación de células como las esteladas. Otra, propuesta, es que alguna de las células endocrinas que producen alguna otra hormona (ejemplo: gonadotropas) presente un fenómeno de cooperación y se transforme en cosomatotropa. En particular, apoyados en los hallazgos descritos en párrafos anteriores, la cooperación es la opción que creemos más viable, si bien, no es posible descartar el que existan otras vías para que algunas células produzcan GH.

Se ha preferido utilizar el término de células GH inmunoreactivas a somatotropas debido a que el anticuerpo utilizado, aunque ha sido ampliamente usado en diversos laboratorios para la detección de GH en *Carassius auratus* a través de radioinmunoanálisis, y con ello validado su uso, no se ha aplicado en técnicas de inmunohistoquímica, y al ser este IgG de tipo policlonal, no podemos descartar completamente, que no presente un mínimo de reacción cruzada con otras hormonas estrechamente emparentadas como la prolactina y la somatolactina, por lo cual una sugerencia para futuros trabajos sería utilizar anticuerpos monoclonales altamente específicos contra GH y desechar completamente la posibilidad de una reacción cruzada.

De igual forma, es recomendable el realizar la cuantificación de células, así como medir los efectos del estradiol en sistemas de células aisladas de la hipófisis, lo que permitiría, el determinar una respuesta particular a un estímulo específico.

CONCLUSIONES

- En hembras inmaduras, recrudescientes y maduras del pez dorado la administración de implantes de estradiol aumenta la cantidad de células GH inmunoreactivas en la hipófisis.
- Existe una variación en el número de células hipofisarias GH inmunoreactivas en hembras en los tres distintos estados reproductivos del pez dorado, implantadas con estradiol.
- El modelo de los implantes de esteroides en el pez dorado es útil para el estudio de los mecanismos que regulan la liberación de GH.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Meguid, S.S; Shieh, H.S; Smith, W.W; Dayringer, H.E; Violand, B. N; Bentle, L. A. 1987. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6434-6437.
- Arámburo, C; Carranza, M; Martínez, H; Luna, M. 1997. A comparative overview of growth hormone: proteins and genes. In: Adv. Comp. Endocrinol. Monduzzi Ed. Pp. 893-898.
- Argellon, L.B; Davis, S. L; Lin, C. M; Chen, T.T; Powers, D.A. 1988. Rainbow trout has two genes for growth hormone. Mol. Reprod. Dev. 1: 11-17.
- Batten, T. F., Wigham, T. 1984. Effects of TRH and somatostatin on releases of prolactin and growth hormone *in vitro* by the pituitary of *Poecilia latipinna*. II. Electron-microscopic morphometry using automatic image analysis. Cell Tissue Res. 237: 595-603.
- Björnsson, B. Th. 1997. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. Fish Physiol. Biochem. 17:9-24.
- Blaise, O. P. y. Le Blail y C. Weil. 1995. Lack of gonadotropin-releasing hormone action on in vivo an in vitro growth hormone release in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol. 110C: 133-141.
- Breton, B., Sambroni, E. 1996. Steroid activation of the brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 101: 155-164.
- Bruns, Ch, Weckbecker, G; Raulf, H. L; Hoyer; D. 1995. Characterization of somatostatin receptors subtypes. In Somatostatin and its receptors. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 190) pp 89-110.

- Canosa, L.F., Lin, X., Peter, R. E. 2002. Regulation of expression of somatostatin genes by sex steroid hormones in goldfish forebrain. *Neuroendocrinol.* 76: 8-17.
- Canosa, L.F., Lin, X., Peter, R. E. 2003. Effects of sex steroid hormones on the expression of somatostatin receptors SST-1 and SST-5 in goldfish pituitary and forebrain. *Neuroendocrinol.* 78: 81-89.
- Canosa, L. F., Cérda-Reverter, J. M., Peter, R. E. 2004. Brain mapping of three somatostatin encoding genes in the goldfish forebrain. *Regul. Pept.* 121: 99-105.
- Cárdenas, R., Lin, X., Canosa, L.F., Luna, M., Aramburo, C., Peter, R.E., 2003. Estradiol reduces pituitary responsiveness to somatostatin and downregulates the expression of somatostatin SST-2 receptors in female goldfish pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 119-124.
- Cárdenas R. R. 2005. Influencia de tratamientos con estradiol en la secreción de hormona de crecimiento, después de la aplicación de somatostatina en el pez dorado. Tesis. Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM.
- Carlsson, L., Eriksson, E., Seeman, H. and Jansson, J. O. 1987. Oestradiol increases baseline growth hormone levels in the male rat: possible direct action on the pituitary. *Acta Physiol. Scand.* 129: 393-399.
- Carnevali, O., Cardinali, M., Maradonna, F., Parisi, M., Olivotto, I., Polzonetti-Magni, A.M., Mosconi, G., Funkenstein, B., 2005. Hormonal regulation of hepatic IGF-I and IGF-II gene expression in the marine teleost *Sparus aurata*. *Mol. Reprod. Dev.* 71: 12–18.
- Cook, A. F., Peter, R. E. 1984. The effects of somatostatin on serum growth hormone levels in goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54: 109-113.
- Chan, C.B., Fung, C.K., Fung, W., Tse, M.C., Cheng, C.H., 2004a. Stimulation of growth hormone secretion from seabream pituitary cells in primary culture by

growth hormone secretagogues is independent of growth hormone transcription. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 139: 77–85.

- Chan, C. B., Leung, P. K., Wise, H., Cheng, C.H. 2004b. Signal transduction mechanism of the seabream growth hormone secretagogue receptor. *FEBS Lett.* 577: 147–153.
- Chang, P. J; Van Goor F; Jobin M. R. Lo A. 1996. GnRH Signaling in Goldfish Pituitary Cells. *Biol. Signals.* 5: 70-80.
- Chang, J. P; Yu, K. L., Wong A.O.L. Peter, R. E. 1990. Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release *in vitro* in goldfish. *Neuroendocrinol.* 51: 664-674.
- Childs, G. V. 2000. Growth hormone cells as co-gonadotropes: partners in the regulation of the reproductive system. *Trends Endocrinol. Metab.* 11: 168 -175.
- Childs, G. V. 2001. Differential expression of estradiol receptors α γ β by gonadotropes during the estrous cycle. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 665-666.
- Childs, G. V. 2002a. Growth hormone cells as co-gonadotropes: partners in the regulation of the reproductive system. *TEM* 11: 168-175.
- Childs, G. V. 2002b. Development of gonadotropes may involve cyclic transdifferentiation of growth hormone cells. *Arch. Physiol. Biochem.* 110: 42-49.
- Childs, G. V, Iruthayanathan M, Akhter N, Unabia G and Whitehead-Johnson B. 2005a. Biopotential effects of estrogen on growth hormone synthesis and storage *in vitro*. *Endocrinol.* 146(4): 1780-1788.
- Childs, G. V, Unabia G, Wu P. 2005b. Differential expression of growth hormone messenger ribonucleic acid by somatotropes and gonadotropes in male and cycling female rats. *Endocrinol.* 141: 1560-1570.

- Drennon, K., Moriyama, S., Kawauchi, H., Small, B., Silverstein J., Parhar, I., Shepherd, B., 2003. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of plasma growth hormone (GH) levels in channel catfish (*Ictalurus punctatus*): assessment of environmental salinity and GH secretagogues on plasma GH levels. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133: 314-322.
- Eckert, R. Randall, D., y Agustine, G. 1990. *Fisiología Animal: Mecanismos y adaptaciones*. 3ra. Interamericana McGraw-Hill. México. pp. 293-298.
- Elson, C. O; Holland, S. P., Dertzbaugh, M. T., Cuff, D. F; Anderson, A. O. 1995. Morphologic and functional alterations of mucosal T cells by cholera toxin and Hs B subunit 1. *J. Immunol.* 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.
- Evans, W. S; Krieg, R. J; Limber, E. R; Kaiser D. L. and Thorner, M. O. 1985. Effects of in vivo gonadal hormone environment on in vitro hGRF-40 stimulated GH release. *Am. J. Physiol.* 249: E276-E280.
- Farchi-Pisanty, O., Hackett Jr., P.B., Moav, B. 1995. Regulation of fish growth hormone transcription. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4: 215-223.
- Fruchman, S., Jackson, L., Borski, R., 2000. Insulin-like growth factor I disparately regulates prolactin and growth hormone synthesis and secretion: studies using the teleost pituitary model. *Endocrinol.* 141: 2886-2894.
- Fruchman, S., McVery, D. C., Borski, R. J. 2002. Characterization of pituitary IGF-I receptors: modulation of prolactin and growth hormone. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R468-R476.
- Ge, W., Peter, R.E., 1994. Activin-like peptides in somatotrophs and activin stimulation of growth hormone release in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 213-221.

- Herrero, T. M. J. , Rodríguez, R. E. , Velasco, A. G., González, S. R., Aijón, J. y Lara J. M. 2003. Growth hormone expresión in ontogenic development in gilthead sea bream. *Cell Tissue Res.* 313: 81-92.
- Himick, B.A., Golosinski, A.A., Jonsson, A.C., Peter, R. E. 1993. CCK/gastrinlike immunoreactivity in the goldfish pituitary: regulation of pituitary hormone secretion by CCK-like peptides in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92: 88-103.
- Himick, B.A., Peter, R. E. 1995. Bombesin-like immunoreactivity in the forebrain and pituitary and regulation of anterior pituitary hormone release by bombesin in goldfish. *Neuroendocrinol.* 61: 365-376.
- Holloway, A.C., Leatherland, J.F. 1997. The effects of N-methyl-D,L-aspartate and gonadotropin-releasing hormone on in vitro growth hormone release in steroid-primed immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 107: 32-43.
- Holloway, A.C., Leatherland, J.F. 1998. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in teleost fishes with emphasis on the involvement of gonadal sex steroids. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 8: 409-429.
- Ho, K. Y., Evans, W. S., Blizzard, R. M., Veldhuis, J. D., Merriam, G. R., Samojlik, E., Furlanetto, R., Rogol, A. D., Kaiser, D. L. and Thorner, M. O. 1987. Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. *J. Clin. Endocr. Metab.* 64: 51-58.
- Huggard, D., Khakoo, Z., Kassam, G., Habibi, H. R. 1996. Effect of testosterone on growth hormone gene expression in the goldfish pituitary. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 1039-1046.
- Hull, K. L., Harvey, S. 2000. Growth hormone: A reproductive endocrine-paracrine regulator. *Rev. Reprod.* 5: 175-182.

- Hull, K. L., Harvey, S. 2002. GH as a co-gonadotropic: the relevance a correlative changes in GH secretion and reproductive state. *J. Endocrinol.* 72: 1-19.
- Johansen, B., Johansen, O. C., Valla, S. 1989. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from atlantic salmon (*Salmo solar*). *Gene* 77: 317-324.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Moriyama, S., Takahashi, A., Kawauchi, H., Kangawa, K., 2003a. Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinol.* 144: 5215-5226.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., Kangawa, K., 2003b. Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J. Endocrinol.* 176: 415-423.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., Kangawa, K., 2003c. Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 135: 421–429.
- Kajimura, S., Uchida, K., Yada, T., Hirano, T., Aida, K., Gordon Grau, E., 2002. Effects of insulin-like growth factors (IGF-I and -II) on growth hormone and prolactin release and gene expression in euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127: 223-231.
- Kasper R. S; Shved N; Takahashi A; Reinecke M; Eppler E. 2006. A systematic immunohistochemical survey of the distribution patterns of GH, prolactin, somatolactin, β -TSH, β -FSH, β -LH, ACTH, and α -MSH in the adenohypophysis of *Oreochromis niloticus*, the Nile tilapia. *Cell Tissue Res.* 325: 303–313.
- Klausen, C; Chang, J. P; Habibi, H. R. 2001. The effect of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone and gonadotropin subunit gene expression in the pituitary of goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129: 511-516.

- Kwong, P. y Chang, J. P. 1997. Somatostatin inhibition of growth hormone release in goldfish: possible targets of intracellular mechanism of actions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 75-85.
- Law, M.S; Cheng, K. W; Fung, T. K; Chan, Y. H; Yu, K. M. 1996. Isolation and characterization of two distinct growth hormone cDNAs from the goldfish, *Carassius auratus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 330: 19-23.
- Lee, E.K., Chan, V.C., Chang, J.P., Yunker, W.K., Wong, A.O., 2000. Norepinephrine regulation of growth hormone release from goldfish pituitary cells. I. Involvement of α_2 adrenoreceptor and interactions with dopamine and salmon gonadotropin-releasing hormone. *J. Neuroendocrinol.* 12: 311-322.
- Le Gac, F; Blaise, O; Fostier, A; LeBail, P.Y; Loir, M; Mourot, B; Weil, C. 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 219-232.
- Li, W. S; Lin, H. R; Wong, A. O. 2002. Effects of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone secretion and gene expression in common carp pituitary. *Comp. Biochem. Physiol. B* 132: 335-341.
- Lin, X. W., Lin, H. R. y Peter. 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 , H. R; Lu, M; Lin, X. W; Zhang, W. M; Sun , Y. Chen, L. X. 1995. Effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogs and sex steroids on growth hormone (GH) secretion and growth in common carp (*Cyprinus carpio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture.* 135, 174-184.
- Lin, X. W. y R. E. Peter. 1999. Expression of three distinct somatostatin mRNAs in goldfish brain: Characterization of cDNAs, distribution and seasonal variations of the mRNAs, and action of a somatostatin-14 variant. *Endocrinol.* 140:2089-2099.

- Lin, X.W., Janovick, J.A., Cardenas, R., Conn, P.M., Peter, R. E. 2000. Molecular cloning and expression of a type-two somatostatin receptor in goldfish brain and pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 166: 75-87.
- Luo, D., McKeown, B. A., River, J. y 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.
- Luo, D., McKeown, B. A. 1991. Interaction of carp growth hormone-releasing factor and somatostatin on in vitro release of growth hormone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Neuroendocrinol.* 54: 359-364.
- Marchant, T.A; Fraser, R. A; Andrews, P.C; Peter, R.E. 1987. The influence of mammalian and teleost somatostatins on the secretion of growth hormone from goldfish (*Carassius auratus L.*), pituitary fragments *in vitro*. *Regul. Peptides* 17: 41-52.
- Marchant, T.A., Chang, J. P; Nahorniak, C. S. y Peter, R.E. 1989a. Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinol.* 124: 2509-2518.
- Marchant, T.A., Peter, R.E. 1989b. Hypothalamic peptides influencing growth hormone secretion in the goldfish, *Carassius auratus*. *Fish. Physiol. Biochem.* 7: 133-139.
- Melamed, P., Eliahu, N., Levavi S. B., Ofir, M., Farchy- Pisanty, O., Rentier-Delrue, F., Smal, J., Yaron, Z. y Naor, Z. 1995a. Hypotalamic and thyroidal regulation of growth hormone in tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 13-30.
- Melamed, P., Eliahu, N., Ofir, M., Levavi-Sivan, B., Smal, J., Rentier-Delrue, F., Yaron, Z., 1995b. The effects of gonadal development and sex steroids on growth hormone secretion in the male tilapia hybrid (*Oreochromus niloticaxO. aureus*). *Fish Physiol. Biochem.* 14: 267–277.

- 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 mRNA levels of gonadotropin II β subunit and growth hormone in the teleost fish, tilapia. *Neuroendocrinol.* 64: 320-328.
- Melamed, P; Rosenfeld, H; Elizur, A., Yaron, Z. 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 119: 325-338.
- Melamed, P., Gur, G., Rosenfeld, H., Elizur, A., Yaron, Z., 1999. Possible interactions between gonadotrophs and somatotrophs in the pituitary of tilapia: apparent roles for insulin-like growth factor I and estradiol. *Endocrinol.* 140: 1183–1191.
- Moav, B., McKeown, B.A., 1992. Thyroid hormone increases transcription of growth hormone mRNA in rainbow trout pituitary. *Horm. Metab. Res.* 24: 10–14.
- Montero, M; Yon, L; Rousseau, K; Arimura, A; Fournier, A; Dufour, D; Vaudry, H. 1998. Distribution, characterization, and growth hormone-releasing activity of pituitary adenylylate cyclase-activating polypeptide in the *European eel*, *Anguilla anguilla*. *Endocrinol.* 139: 4300-4310.
- Montero, M., Yon, L., Kikuyama, S., Dufour, S., Vaudry, H. 2000. Molecular evolution of the growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylylate cyclase-activating polypeptide gene family. Functional implication in the regulation of growth hormone secretion. *J. Mol. Endocrinol.* 25: 157–168.
- Nelson, E. L. y Sheridan Mark A. 2005. Regulation of somatostatins and their receptors in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142: 117-133.
- Norris, D. O. 1997. *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press. U.S.A. p.p. 167-169.

- Otto, C.J., Lin, X., Peter, R.E., 1999. Dopaminergic regulation of three somatostatin mRNAs in goldfish brain. *Regul. Pept.* 83: 97-104.
- Oyama, H., Martín, J., Sussman, K., Weir, G. C., Permutt, A. 1981. The biological activity of catfish pancreatic somatostatin. I. *J. Biol. Chem.* 255, 2251-2254.
- Peng, C., Huang, Y.P., Peter, R.E. 1990. Neuropeptide Y stimulates growth hormone and gonadotropin release from the goldfish pituitary in vitro. *Neuroendocrinol.* 52: 8-34.
- Peng, C., Chang, J.P., Yu, K.L., Wong, A.O., Van Goor, F., Peter, R.E., Rivier, J. E. 1993. Neuropeptide-Y stimulates growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish pituitary: involvement of both presynaptic and pituitary cell actions. *Endocrinol.* 132: 1820-1829.
- Peng, C., Peter, R.E. 1997. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and in fish. *Zool. Studies* 36:79-89.
- Pérez-Sánchez, 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, 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. y Chang, J. 1999. Brain regulation of growth hormone secretion and food intake in fish. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York. pp. 55-99.
- Peterson, B.C., Small, B.C. 2005. Effects of exogenous cortisol on the GH/IGFI/IGFBP network in channel catfish. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28: 391-404.

- Rand-Weaver, M., Walther, B. T., Kawauchi, H. 1989. Isolation and characterization of growth hormone from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Gen Comp. Endocrinol. 73: 260-269.
- Rivas, R. J., Nishioka, R. S., Bern, H. A. 1986. In vitro effects of somatostatin and urotensin II on prolactin and Growth hormone secretion in tilapia, (*Oreochromis mossambicus*). Gen. Comp. Endocrinol. 63: 245-251.
- Rousseau, K; Le Belle, N; Marchelidon, J; Chow, B. K; Boeuf, G; Dufour, S. 2001. Pituitary growth hormone secretion in the turbot, a phylogenetically recent teleost, is regulated by a species-specific pattern of neuropeptides. Neuroendocrinol. 74: 375-385.
- Sekine, S; Mizukami, T; Saito A; Kawauchi, H; Ito, S. 1989. Isolation and characterization of a novel growth hormone cDNA from chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Biochem. Biophys. Acta 1009: 117-120.
- Seuntjesns, E ; Hauspie A ; Roudbaraki M ; Vankelecom y Denef C. 2002. Combined Expression of Different Hormone Genes in Single Cells of Normal Rat and Mouse Pituitary. Archives of Physiol. Biochem. 110 :12-15.
- Shulman, D. I ; Sweetland, M ; Duckett, G. And Root , A, W. 1987. Effect of estrogen on the growth hormone (GH) secretory response to GH-releasing factor in the castrate adult female rat in vivo. Endocrinol. 120 : 1047-1051.
- Stefanini, M; de Martino. C. y Zamboni, L. 1967. Buffer formaldehyde with picrte. En Histological and histochemical methods. Ed. Kiernan, J. A. Pergamon press. New York. pp. 29-30.
- Somoza, G.M., Peter, R. E. 1991. Effects of serotonin on gonadotropin and growth hormone release from in vitro perfused goldfish pituitary fragments. Gen. Comp. Endocrinol. 82: 103–110.

- Sweeting, R. M., McKeown, B. A. 1987. Somatostatin reduces plasma growth hormone levels during seawater adaptation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Can. J. Zool. 64: 2062-2063.
- Taylor y Burns. 1974. Localization of immunoglobulins in parafin sections for formaldehyde fixed tissues. En Techniques in clinical immunology. Ed. por Thompson R.A. Blackwell scientific publication. Oxford. 1981.
- Trudeau. L., Peter, R.E., Sloley, B. D. 1991. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. Biol. Reprod. 44,951-960.
- Trudeau, V.L., Somoza, G.M., Nahorniak, C.S., Peter, R.E. 1992. Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. Neuroendocrinol. 56: 483-490.
- Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Kah, O., Mons, N., Dulka, J.G., Peter, R.E., 1996. Regulation of growth hormone secretion by amino acid neurotransmitters in the goldfish (I): inhibition by N-methyl-D, L-aspartic acid. Gen. Comp. Endocrinol. 103: 129-137.
- Trudeau, V. L., Kah, O., Chang, J. P., Sloley, B. D., Dubourg, P., Fraser, E. J., Peter, R. E. 2000a. The inhibitory effects of γ -aminobutyric acid on growth hormone secretion in the goldfish are modulated by sex steroids. J. Exp. Biol. 203: 1477-1485.
- Trudeau, V.L., Spanswick, D., Fraser, E.J., Lariviere, K., Crump, D., Chiu, S., MacMillan, M., Schulz, R.W., 2000b. The role of amino acid neurotransmitters in the regulation of pituitary gonadotropin release in fish. Biochem. Cell. Biol. 78: 241-259.
- Uchida, K., Yoshikawa-Ebesu, J.S., Kajimura, S., Yada, T., Hirano, T., Gordon Grau, E. 2004. In vitro effects of cortisol on the release and gene expression of

prolactin and growth hormone in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Gen. Comp. Endocrinol. 135: 116-125.

- Unniappan, S., Peter, R. E. 2004. In vitro and in vivo effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol. 286: R1093-R1101.
- Vaughan, J. M; River, J; Peng, C; Chang, J. P; Peter, R. E; Vale, W. 1992. Isolation and characterization of hypothalamic growth-hormone releasing factor from common carp, *Cyprinus carpio*. Neuroendocrinol. 56: 539-549.
- Villaplana M.,García A. A., García H. M. P., Agulleird B. 2003. Inmunoyitochemical and ultrastructural characterization of mammosomatotrope, Growth hormone, and prolactine cells from the gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*, Teleostei): an ontogenic study. J. Morphol. 255: 347-357.
- Viollet, C ; Prévost, G ; Maubert, E ; Faivre-Bauman, A ; Gardette, R ; Kordon, C ; Lourdes, C ; Slam, A ; Epelbaum, J. 1995. Molecular pharmacology of somatostatin receptors. Fundam. Clin. Pharmacol. 9: 107-113.
- Vong, Q.P., Chan, K.M., Cheng, C.H. 2003a. Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. J. Endocrinol. 178: 513-521.
- Vong, Q.P., Chan, K.M., Leung, K., Cheng, C.H. 2003b. Common carp insulinlike growth factor-I gene: complete nucleotide sequence and functional characterization of the 5'-flanking region. Gene 322: 145-156.
- Weil, C ; Carre, F ; Blaise, O ; Breton, B ; Le Bail, P. Y. 1999. Differential effect of insulin-like growth factor I on in vitro gonadotropin (I and II) and growth hormone secretions in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) at different stages of the reproductive cycle. Endocrinol. 140: 2054-2062.
- 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., Chang, J.P., Peter, R. E. 1993a. Characterization of D1 receptors mediating dopamine-stimulated growth hormone release from pituitary cells of the goldfish, *Carassius auratus*. *Endocrinol.* 133: 577-584.
- Wong, A.O.L., Chang, J.P., Peter, R.E. 1993b. In vitro and in vivo evidence that dopamine exerts growth hormone-releasing activity in goldfish. *Am. J. Physiol.* 264: E925–E932.
- Wong, A.O.L., Chang, J.P., Peter, R.E. 1993c. Interaction of somatostatin, gonadotropin-releasing hormone, and the gonads on dopamine-stimulated growth hormone release in the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92, 366-378.
- Wong, A.O.L., Van der Kraak, G., Chang, J. P. 1994. Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate mediates dopamine D1-stimulated growth hormone release from goldfish pituitary cells. *Neuroendocrinol.* 60: 410-417.
- Wong A.O.L., Leung M. Y., Shea, W. L., Chang, J. P., Chow, B. K. 1998a. Hypophysiotropic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: immunohistochemical demonstration of PACAP in the pituitary, PACAP stimulation of growth hormone release from pituitary cells, and molecular cloning of pituitary type I PACAP receptor. *Endocrinol.* 139: 3465-3479.
- Wong, A.O.L; Ng, S; Lee, E. K; Leung, R. C; Ho, W. K. 1998b. Somatostatin inhibits (D-Arg6, Pro9-Net) salmon gonadotropin-releasing hormone-and dopamine D1-stimulated growth hormone release from perfused pituitary cells of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110: 29-45.
- Wong, A.O.L., Murphy, C.K., Chang, J.P., Neumann, C.M., Lo, A., Peter, R.E., 1998c. Direct actions of serotonin on gonadotropin-II and growth hormone release from goldfish pituitary cells: interactions with gonadotropin-releasing hormone and dopamine and further evaluation of serotonin receptor specificity. *Fish Physiol. Biochem.* 19: 23–24.

- Wong, A. O. L.; Li, W. S., Lee, E. K., Leung, M. Y., Tse, L. Y., Chow, B. K., Lin, H. R., Chang, J. P. 2000. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide as a novel hypophysiotropic factor in fish. *Biochem. Cell. Biol.* 78: 329-343.
- Wong A.O.L., Zhou H., Jiang Yonghua Jiang, Ko. W. K.W. 2005. Feedback regulation of growth hormone synthesis and secretion in fish and the emerging concept of intrapituitary feedback loop. *Rev. Comp. Biochem. And Physiol. Part. A.*
- Xiao, D., Chu, M.M., Lee, E.K., Lin, H.R., Wong, A.O.L., 2002. Regulation of growth hormone release in common carp pituitary cells by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: signal transduction involves cAMP- and calcium-dependent mechanisms. *Neuroendocrinol.* 76: 325–338.
- Yada, T., Hirano, T., 1992. Inhibition of growth hormone synthesis by somatostatin in cultured pituitary of rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B* 162: 575–580.
- Yunker, W.K., Lee, E.K., Wong, A.O.L., Chang, J.P., 2000. Norepinephrine regulation of growth hormone release from goldfish pituitary cells: II. Intracellular sites of action. *J. Neuroendocrinol.* 12: 323–333.
- Zhou, J. J., Trudeau, V. L., Cui, Z., Brechin, J., Mackenzie, K., Zhu, Z., Houlihan, D. F., Peter, R.E. 1997. Estradiol stimulates growth hormone production in female goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106 : 102-112.